

ISSN 1563-0625 (print)
ISSN 2313-741X (online)

Том 17, № 4. С. 297-388

2015

Официальный журнал
Санкт-Петербургского Регионального Отделения
Российской Ассоциации
Аллергологов и Клинических Иммунологов

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ



VII Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

31 января – 6 февраля 2016 года
Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

- Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов
- Российское научное общество иммунологов
- Российское цитокиновое общество
- Институт иммунологии ФМБА России
- Институт экспериментальной медицины
- Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
- Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова

В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Ежедневная культурная программа

**Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании
установленного образца**

Координатор проекта:

член-корр. РАН, профессор Тотолян Арег Артемович

197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14

НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора

Тел./факс: (812) 232-00-66

E-mail: totolian@spbraaci.ru

Заявки подавать до 1 декабря 2015 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна

Тел./факс: (812) 233-08-58

E-mail: shkola@spbraaci.ru

Адрес для корреспонденции: 197136, Санкт-Петербург, а/я 58, СПб РО РААКИ

www.spbraaci.ru

www.allergologi-immunologi.ru



САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКОЕ РЕГИОНАЛЬНОЕ ОТДЕЛЕНИЕ
РОССИЙСКОЙ АССОЦИАЦИИ АЛЛЕРГОЛОГОВ И КЛИНИЧЕСКИХ ИММУНОЛОГОВ
(СПб РО РААКИ)

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2015, том 17

№ 4

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдлин Ирина Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Санкт-Петербургского НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии и сероэпидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

Горячкина Людмила Александровна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой клинической аллергологии Российской медицинской академии последиplomного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последиplomного образования Минздрава России, Москва, Россия

Кетлинский Сергей Александрович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Климович Владимир Борисович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель лаборатории гибридной технологии Российского научного центра радиологии и хирургических технологий Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, директор НИИ клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, руководитель отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, проректор по лечебной работе Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

Назаров Петр Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spb.aaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

Электронная версия: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Медицинская иммунология

Журнал зарегистрирован Северо-Западным региональным управлением Государственного комитета РФ по печати 26 марта 1999 г.

Свидетельство о регистрации № П 3612.

Министерством РФ по делам печати, телерадиовещания и средств массовых коммуникаций 30 июня 2003 г.

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор)

Свидетельство о регистрации средства массовой информации ПИ №ФС77-60436 30 декабря 2014 г.

Издательство «Человек»

199004, Россия, Санкт-Петербург, Малый пр. В.О., 26, оф. 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

Тел./факс: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Подписано в печать 18.08.2015 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 11,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1218

Напечатано в ООО «ИПК Береста».

196084, Россия, Санкт-Петербург, ул. Коли Томчака, 28.

Тел.: (812) 388-90-00

С 2001 г. журнал «Медицинская иммунология» регулярно входит в «Перечень ведущих рецензируемых научных журналов и изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертации на соискание ученой степени доктора наук», рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ.

С 2014 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу Ulrich's Periodicals Directory

Недоспасов Сергей Артурович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой иммунологии МГУ им. М.В. Ломоносова и заведующий отделом молекулярной иммунологии в Институте физико-химической биологии им. Белозерского МГУ, Москва, Россия

Пинегин Борис Владимирович – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунодиагностики и иммунокоррекции ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Симбирцев Андрей Семенович – доктор медицинских наук, профессор, директор Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Смирнов Вячеслав Сергеевич – доктор медицинских наук, профессор, научный руководитель Медико-биологического научно-производственного комплекса «Цитомед», Санкт-Петербург, Россия

Хаитов Рахим Мусаевич – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, директор ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

Черных Елена Рэмовна – доктор медицинских наук, профессор, член-корреспондент РАН, заместитель директора по научной работе НИИ клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Новосибирск, Россия

Редакционный совет

Ласунская Елена – доктор медицинских наук, профессор, Государственный университет Северной Флориды, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

Мароди Ласло – доктор медицинских наук, профессор, Университет Дебрецена, Медицинский научный центр, Отдел инфекционной и педиатрической иммунологии, Дебрецен, Венгрия

Михалеk Ярослав – доктор медицинских наук, Университет города Брно, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

Роггенбук Дирк – доктор медицинских наук, профессор, Университет Лаузиц «University of Applied Sciences», Зенфтенберг, Германия

Сеонг Сеунг-Йонг – доктор медицинских наук, Национальный Университет, руководитель кафедры микробиологии и иммунологии, Сеул, Корея

Тендлер Евгений – доктор медицинских наук, Медицинский центр Рамбам, Отдел клинической биохимии, Хайфа, Израиль

Фейст Евгений – доктор медицинских наук, Университет Гумбольдта, клиника «Шаритэ», руководитель отделения ревматологии и клинической иммунологии, Берлин, Германия

Халдояниди Софья – доктор медицинских наук, профессор, Институт молекулярных исследований, Сан-Диего, Калифорния, США

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

July-August

2015, volume 17

No. 4

Published since March 1999

Editor-in-Chief

Irina S. Freidlin – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief researcher, St. Petersburg, Russia

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Deputy-director on Science, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russia

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russia

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, chief, Moscow, Russia

Sergei A. Kettinskij – PhD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Deputy-director on Science, St. Petersburg, Russia

Vladimir B. Klimovich – PhD, MD, Professor, Russian Center of Radiology and Surgery Technologies, Laboratory of Hybridoma technology, chief, St. Petersburg, Russia

Vladimir A. Kozlov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Clinical Immunology, Director, Novosibirsk, Russia

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief, St. Petersburg, Russia

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, Vice Rector for Clinical Affairs, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russia

Petr G. Nazarov – PhD, MD, Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief, St. Petersburg, Russia

Sergei A. Nedospasov – PhD, Professor, RAS corresponding member, Lomonosov State University, Department of Immunology, chief; Institute of Physico-Chemical Biology, Belozersky, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russia

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58

Address for correspondence:

197136, St. Petersburg, P.O. Box 58.

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Federal Service for Supervision of Communications and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyye pers. Vassilievsky Island, 26, office 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

Phone/fax: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Passed for printing 18.08.2015. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 11,5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Produced at the IPK Beresta Printing House.

196084, Russian Federation, St. Petersburg, Kolya Tomchak str., 28.

Phone: (812) 388-90-00

Since 2001, the Medical Immunology Journal is admitted to the Index of leading peer-reviewed scientific Journals intended for publication of key research results of MD Theses, as recommended by the Higher Attestation Commission of the Russian Ministry of Education and Science

Since 2014 the Medical Immunology Journal is included into international Ulrich's Periodicals Directory database

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnosics and Immunotherapy, Chief, Moscow, Russia (ORCID, ReseacherID)

Andrei S. Simbirtsev – PhD, MD, Professor, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Director, St. Petersburg, Russia

Viacheslav S. Smirnov – PhD, MD, Professor, "Cytomed" Ltd., Director on Science, St. Petersburg, Russia

Rahim M. Khaitov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Immunology, Director, Moscow, Russia

Elena R. Chernykh – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, Institute of Clinical Immunology, Deputy-director on Science, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Chief, Novosibirsk, Russia

Editorial Council

Eugen Feist – PD, MD, Department of Rheumatology and Clinical Immunology, Charité – Universitätsmedizin Berlin, Free University and Humboldt University of Berlin, Berlin, Germany

Sophia Khaldoyanidi – PhD, MD, Associate Member, Torrey Pines Institute for Molecular Studies, San Diego, CA, USA

Elena Lasunskaja – PhD, MD, Associated Professor, Laboratory of Biology of Recognition, Universidade Estadual do Norte Fluminense, Rio de Janeiro, Brazil

László Maródi – PhD, MD, Professor, Department of Infectious and Pediatric Immunology, University of Debrecen Medical and Health Science Centre, Debrecen, Hungary

Jaroslav Michálek – PhD., MD, Faculty of Medicine, Department of Pharmacology, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Dirk Roggenbuck – PhD, MD, Professor, Lausitz University of Applied Sciences, Senftenberg, Germany

Seung-Yong Seong – PhD, MD, Seoul National University, Associate Dean for Planning, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

Yevgeny Tendler – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С.

ИММУНОСУПРЕССОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*303

Оригинальные статьи

Джеллия А.Б., Устюгов Я.Ю., Кортава М.А.

ОЦЕНКА ИММУНОТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ
ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА НА МАКАКАХ РЕЗУС319

Ширинский И.В., Сазонова О.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С.

КОМОРБИДНОСТЬ, МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И АУТОИММУНИТЕТ ПРИ ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННОМ
ОСТЕОАРТРИТЕ: ПОИСКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ327

Харченко Е.П.

ИММУНОЭПИТОПНЫЙ КОНТИНУУМ РОДСТВА БЕЛКОВ, ПОЛИРЕАКТИВНОСТЬ И АУТОРЕАКТИВНОСТЬ
АНТИТЕЛ335

Лосев И.В., Доница С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г., Найхин А.Н.

ОБНАРУЖЕНИЕ У ЛЮДЕЙ КРОССРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ И Т-КЛЕТОК ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ
К АНТРОПОНОЗНЫМ И ЗООНОЗНЫМ ПОДТИПАМ ВИРУСА ГРИППА А.....347

Шадуро Д.В., Белоглазов В.А., Гордиенко А.И.

УРОВНИ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ СВЯЗЬ С КЛЕТОЧНЫМ И ГУМОРАЛЬНЫМ
ЗВЕНОМ АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ.....359

Албегова Д.З., Павлова С.И., Лаптев О.С., Негребецкий В.В., Кягова А.А., Козырь Л.А., Албегова Ж.К., Козлов И.Г.

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО БИОФЛАВОНОИДА НА ЛИМФОЦИТЫ-ЭФФЕКТОРЫ РЕАКЦИИ
КОНТАКТНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У МЫШЕЙ367

Материалы XV Всероссийского научного Форума с международным участием
имени академика В.И. Иоффе «Дни Иммунологии» в Санкт-Петербурге,
1-4 июня 2015 г. (тезисы, не вошедшие в Специальный выпуск журнала
«Медицинская иммунология», 2015, т. 17)..... 375

Дневник иммунолога..... 383

Правила для авторов 385

Авторский указатель 388

Предметный указатель 388

CONTENTS

Reviews

Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., Freidlin I.S.

IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES*303

Original articles

Dzheliya A.B., Ustyugov Ya.Yu., Kortava M.A.

EVALUATION OF IMMUNOTOXICITY OF THE THERAPEUTIC DRUG PROLONGED ACTION FOR MULTIPLE SCLEROSIS ON RHEBUS MONKEYS319

Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S.

COMORBIDITY, DNA METHYLATION AND AUTOIMMUNITY IN DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS: AN EXPLORATORY STUDY327

Kharchenko E.P.

IMMUNE EPITOPE CONTINUUM OF THE PROTEIN RELATIONSHIPS, POLY- AND AUTOREACTIVITY OF ANTIBODIES335

Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Doroshenko E.M., Rudenko L.G., Naykhin A.N.

CROSSREACTIVE ANTIBODIES AND MEMORY T CELLS TO HUMAN AND ZOONOTIC INFLUENZA A VIRUSES IN VOLUNTEERS347

Shaduro D.V., Beloglazov V.A., Gordienko A.I.

MAJOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND THEIR ASSOCIATIONS WITH CELLULAR AND HUMORAL ANTI-ENDOTOXIN IMMUNITY359

Albegova D.Z., Pavlova S.I., Laptev O.S., Negrebetsky V.V., Kyagova A.A., Kozyr L.A., Albegova J.K., Kozlov I.G.

INFLUENCE OF MODIFIED BIOFLAVONOIDS UPON EFFECTOR LYMPHOCYTES IN MURINE MODEL OF CONTACT SENSITIVITY367

Materials of XVth Russian Forum with international participation in memory of Academician V.I. Ioffe "Immunology Days" in St. Petersburg, June 1-4, 2015 (theses not included in Special Issue of the Medical Immunology Journal, 2015, vol. 17)375

Chronicle383

Instructions to Authors385

Author index388

Subject index388

ИММУНОСУПРЕССОРНЫЕ ЭФФЕКТЫ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Старикова Э.А., Соколов А.В., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С.

ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Многие патогенные микроорганизмы используют метаболические пути аргинина для успешной диссеминации. Бактериальная аргининдеиминаза гидролизует аргинин с образованием одной молекулы аммиака и двух молекул АТФ. Активность фермента способствует улучшению выживаемости патогенных бактерий в условиях пониженной кислотности в очаге инфекции или в фаголизосомах, в анаэробных условиях, а также приводит к дефициту аргинина. Метаболизм аргинина играет важную роль в регуляции функций клеток иммунной системы. У млекопитающих аргинин является субстратом ферментов NOS и аргиназы. Деплеция аргинина является одним из механизмов иммуносупрессии. В обзоре проводится анализ данных литературы о влиянии стрептококковой аргининдеиминазы на метаболизм аргинина эукариотических клеток, а также обсуждается иммуносупрессорное действие фермента.

Ключевые слова: аргининдеиминаза, *Streptococcus pyogenes*, иммуносупрессия

IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Starikova E.A., Sokolov A.V., Burova L.A., Freidlin I.S.

Research Institute of Experimental Medicine, North-Western Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Many pathogens use metabolic pathway of arginine for successful dissemination. Bacterial arginine deiminase hydrolyzes arginine to form one molecule of ammonia and two molecules of ATP. The activity of the enzyme contributes to the improvement of survival of pathogenic bacteria in conditions of low pH at the site of infection or in phagolysosome, as well as in anaerobic conditions, and also leads to deficiency of arginine. Metabolism of arginine plays an important role in regulating the functions of immune system cells in mammals. Arginine is a substrate of enzymes NOS and arginase. Arginine depletion, potentially contributes to immunosuppression. The review analyzed the literature data on the effect of streptococcal arginine deiminase on the metabolism of arginine eukaryotic cells, and discusses immunosuppressive action of the enzyme.

Keywords: arginine deiminase, *Streptococcus pyogenes*, immunosuppression

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69, 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Starikova Eleonora A.
Research Institute of Experimental Medicine, North-Western
Branch, Russian Academy of Sciences
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69, 234-68-68.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.А. Старикова, А.В. Соколов, Л.А. Бурова, И.С. Фрейдлин,
«Иммуносупрессорные эффекты аргининдеиминазы
Streptococcus pyogenes» // Медицинская иммунология, 2015.
Т. 17, № 4. С. 303–318.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-303-318

© Старикова Э.А., 2015

For citation:

E.A. Starikova, A.V. Sokolov, L.A. Burova, I.S. Freidlin,
“Immunosuppressive effects of arginine deiminase from
Streptococcus pyogenes”, *Medical Immunology (Russia)/*
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 303–318.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-303-318

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-303-318>

Введение

С момента открытия аргинина в 1886 г. изучение роли этой аминокислоты в биохимических и физиологических процессах является предметом интенсивных исследований. Значительно усилило интерес исследователей к изучению метаболизма аргинина открытие более ста лет назад того факта, что аргинин является единственным физиологически значимым субстратом для синтеза NO — важной внутри- и межклеточной сигнальной молекулы, вовлеченной в регуляцию многих физиологических и патологических процессов у млекопитающих [85]. Новый виток интереса к изучению метаболизма аргинина был связан с открытием у мышей классической и альтернативной активации макрофагов, в основу которой была положена экспрессия ферментов, метаболизирующих аргинин — NOS (Nitric Oxide Synthase) и аргиназы соответственно [34]. Еще одной важной вехой в изучении метаболизма аргинина явилась расшифровка механизмов иммуносупрессии у онкологических больных, связанных с деpleцией аргинина в результате аргиназной активности миелоидных супрессорных клеток [29]. На важность метаболизма этой аминокислоты в осуществлении защитных реакций указывает тот факт, что многие патогены используют метаболические пути аргинина организма-хозяина для своей успешной инвазии и диссеминации [20]. Одним из ферментов, метаболизирующих аргинин, является бактериальная аргининдеиминаза (АД). До сих пор основное внимание в изучении этого фермента уделялось его антипролиферативным эффектам в отношении эукариотических клеток [6, 32, 63, 98]. Влияние АД на функции клеток иммунной системы остается слабо изученным. В обзоре обсуждаются возможные последствия дефицита аргинина для клеток иммунной системы, вызванные действием АД *Streptococcus pyogenes*, являющимся возбудителем различных нозологических форм стрептококковой инфекции.

Метаболизм аргинина в эукариотических клетках

Аргинин, который поступает с пищей, захватывается клетками эпителия кишечника и переносится через плазматическую мембрану с помощью u^+ системы катионных аминокислотных транспортеров [15]. Концентрация аминокислоты в плазме составляет 80–120 $\mu\text{mol/L}$. Уровень эндогенного синтеза аргинина у здоровых взрослых людей полностью удовлетворяет их метаболические потребности, однако в некоторых случаях (у детей, в условиях воспаления, дисфункциях кишечника или почек, а также при беременности) становится необходимым пополнение недостатка аргинина с пищей [66]. По-

этому аргинин относят к условно незаменимым аминокислотам.

Во взрослом организме ферменты, необходимые для синтеза аргинина *de novo*, экспрессируются не во всех тканях. Три этапа биосинтеза аргинина, имеющих различную компартментализацию в организме млекопитающих, можно разделить на: биосинтез L-орнитина, биосинтез L-цитрулина и биосинтез L-аргинина. Биосинтез L-орнитина из L-глутамината и L-пролина ферментом L- Δ^1 -пирролин-5-карбоксилат (P5C) синтетазой (P5CS) происходит исключительно в тонком кишечнике [105].

Синтез L-цитрулина из L-орнитина зависит от экспрессии орнитинкарбамоилтрансферазы (ОКТ) и карбамоилфосфатсинтетазы 1 (КФС1). Экспрессия обоих ферментов ограничена митохондриальным матриксом гепатоцитов, эпителиальных клеток тонкого и, в меньшей степени, толстого кишечника [86]. В печени эта реакция является частью цикла мочевого кислоты, в то время как L-цитрулин, синтезируемый в кишечнике, высвобождается в циркуляцию для нужд других клеток. Значительная часть циркулирующего в крови L-цитрулина поглощается клетками проксимальных канальцев почек, конвертируется в L-аргинин и в конечном итоге высвобождается в циркуляцию [84, 109].

Биосинтез L-аргинина из L-цитрулина осуществляют цитозольные ферменты аргининосукцинат-синтетаза 1 (ACC1) и аргининосукцинат-лиаза (АСЛ) в отличие от митохондриальных ферментов цикла мочевого кислоты ОКТ и КФС1, ACC и АСЛ экспрессируются во многих типах клеток, хотя уровень их экспрессии и активность значительно различаются [39, 85, 113].

Аргинин является субстратом для четырех ферментов, которые существуют в нескольких изоформах: NO синтаз (NOS1 = nNOS, NOS2 = iNOS и NOS3 = eNOS), аргиназ (аргиназы I и II), аргинин:глицинамидинотрансферазы (АГАТ), и аргининдекарбоксилазы (АДК) (рис. 1). Аргиназы — основные потребители аргинина. NOS и аргининдекарбоксилаза-агматин зависимые пути метаболизма отвечают только за небольшой процент тотального ежедневного оборота этой аминокислоты [5, 83, 85].

Большинство клеток млекопитающих, включая гранулоциты, эритроциты, гепатоциты, миелоидные супрессорные клетки, тучные клетки, эндотелиальные клетки и гладкомышечные клетки, обладают в разной степени выраженной аргиназной и NOS активностью [101]. NOS метаболизируют внутриклеточный аргинин с продукцией цитрулина и оксида азота. Изоэнзимы NOS отличаются по структуре, механизмам регуляции активности и распределению в тканях. nNOS

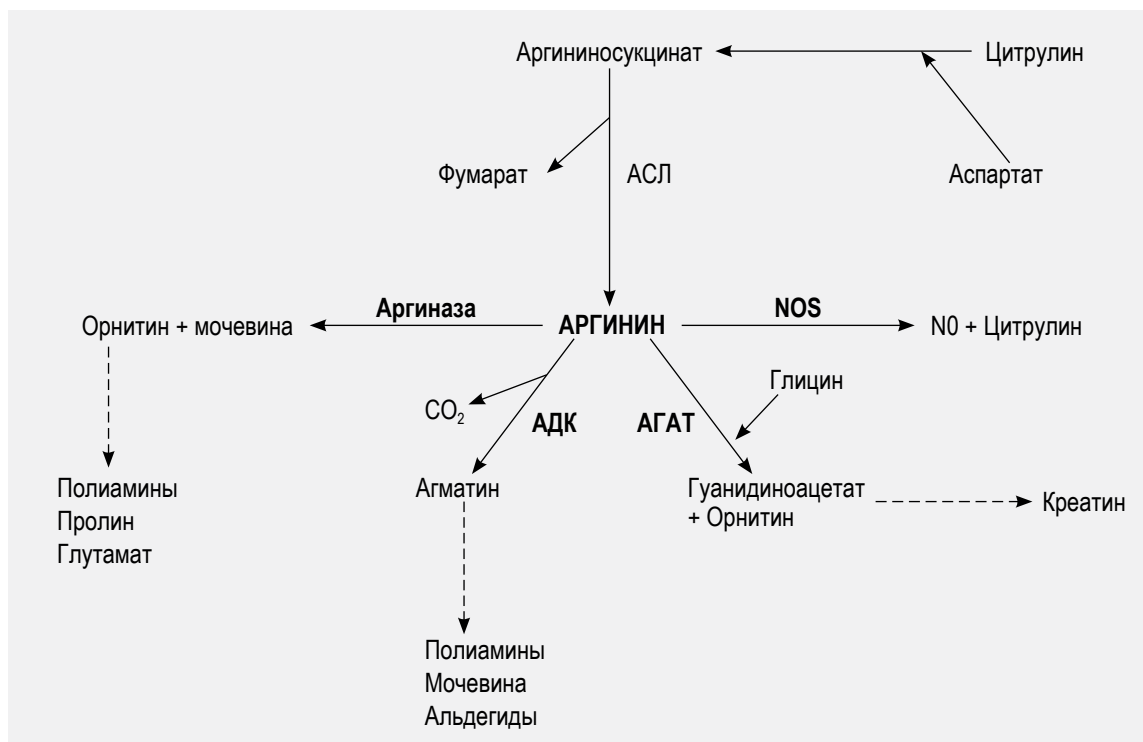


Рисунок 1. Метаболизм аргинина в эукариотических клетках

Примечание. Для простоты приведены только те ферменты, которые метаболизируют аргинин непосредственно. Приведенные на схеме ферменты не обязательно экспрессируются в клетке одновременно. АДК, аргининдекарбоксилаза; АГАТ, аргинин:глицинаминотрансфераза; АСЛ – аргининосукцинат-лиаза; NO, оксид азота; NOS, NO-синтаза (из Patrick Raber, 2012 с изменениями).

и eNOS конститутивно экспрессируются в различных типах клеток. Их активность регулируется за счет Са-зависимого связывания кальмодулина, а также фосфорилирования/дефосфорилирования белка по серину [85]. Активность этих ферментов обычно приводит к низкому уровню продукции NO, который действует как посредник внутриклеточных сигналов (в случае nNOS) и регулирует гомеостаз сосудов (в случае eNOS). nNOS и eNOS обычно экспрессируются в неиммунных клетках: нейронах, мышечных, эндотелиальных клетках. Из-за того, что эти изоформы генерируют относительно небольшое количество NO, их роль в осуществлении защитных реакций незначительна по сравнению с ролью iNOS [59]. Экспрессия iNOS долгое время считалась специфичной для клеток иммунной системы, однако последние исследования показывают, что спектр клеток, экспрессирующих iNOS, может быть значительно расширен [59]. Клетки иммунной системы используют продукцию NO, часто одновременно с продукцией активных форм кислорода (Reactive Oxygen Species – ROS) для борьбы с патогенами и опухолевыми клетками. NO и его активные производные (Reactive Nitrogen Species – RNS) действуют неспецифически на различные мишени в микромолярных концентрациях, что может приводить к повреждению собственных нормальных клеток тканей.

Поэтому активность iNOS строго регулируется за счет индукции транскрипции, которая происходит под влиянием бактериальных токсинов (липополисахарида), а также провоспалительных цитокинов IL-1 β , IFN γ , TNF α . Напротив, противовоспалительные цитокины IL-4, IL-8, IL-10, TGF- β и ряд других факторов оказывают супрессорное действие на транскрипцию гена iNOS. Механизмы, регулирующие доступность внутриклеточного аргинина, тоже играют важную роль в регуляции iNOS-опосредованного синтеза NO [1, 9, 43, 85].

Аргиназы I и II метаболизируют аргинин с продукцией орнитина, который является предшественником полиаминов и пролина, и мочевины – продукта детоксикации катаболизма белков [67]. Аргиназы – классические ферменты цикла мочевины. Аргиназу I исходно считали печеночной изоформой, аргиназу II – внепеченочной, однако спектр клеток, экспрессирующих эти ферменты, оказался значительно шире. Изоэнзимы имеют разную локализацию внутри клетки, аргиназа I является цитозольной формой, а аргиназа II – митохондриальной. Активность аргиназ в значительной степени регулируется на уровне транскрипции. В то же время последние исследования показывают, что активность аргиназы может регулироваться также за счет посттрансляционных изменений. Так,

S-нитрозилирование остатков цистеина (C168 и C303) аргиназы I приводит к стабилизации ее трехмерной структуры и шестикратному усилению аффинности к аргинину [92]. Мочевая кислота также повышает активность аргиназы [120].

АДК и АГАТ не вовлечены в регуляцию функций клеток иммунной системы. У млекопитающих АДК имеет высокий уровень экспрессии в тканях головного мозга [121], а АГАТ экспрессируется в мозге и в сердце [17, 44, 46]. АДК метаболизирует аргинин в агматин, который в свою очередь конвертируется агматиназой в путресцин и мочевины [5]. За исключением ингибиторных эффектов агматина на активность iNOS в макрофагах и анализа экспрессии АДК и АГАТ при взаимодействии *Giardia lamblia* с эпителиальными клетками человека, роль этих ферментов для работы иммунной системы остается мало изученной [9].

Доступность аргинина для метаболических процессов определяется множеством факторов: поступлением аминокислоты с пищей; уровнем экспрессии ферментов, для которых аргинин является субстратом; уровнем эндогенного синтеза в клетке, который в свою очередь зависит от экспрессии соответствующих ферментов; экспрессии транспортеров аминокислоты в плазматической и митохондриальной мембране. Изменения этих параметров могут приводить к дисрегуляции метаболизма аргинина.

Модуляция патогенными микроорганизмами путей метаболизма аргинина в эукариотических клетках

Аргинин является общим субстратом для iNOS и аргиназ. Метаболиты аргинина могут, с одной стороны, служить факторами, обладающими бактерицидными эффектами, и способствовать реализации защитных реакций, с другой — помогать выживанию бактерий. Генерация NO из аргинина в результате активности iNOS обеспечивает цитотоксичность клеток организма-хозяина, направленную на борьбу с патогенными микроорганизмами. В то же время NO может способствовать выживанию внутриклеточных патогенов [16]. Конверсия аргинина в орнитин и мочевины под влиянием аргиназы тоже может усиливать диссеминацию бактерий. В ходе развития бактериальной инфекции, аргинин становится субстратом для бактериальной аргиназы и/или бактериальной АД, кроме того, некоторые бактерии могут регулировать метаболизм аргинина опосредованно, индуцируя экспрессию аргиназы организма-хозяина [20]. Известно, что использование патогенными микроорганизмами путей метаболизма аргинина всегда приводит к снижению продукции NO, однако все остальные эффекты являются специфическими

для каждого патогена, что подробно описано в обзоре Priyanka D. и др., 2010 [20]. Вероятно, такая стратегия используется бактериями, чтобы нарушить функции клеток организма-хозяина, которые необходимы для противодействия патогенам.

Модуляция *Streptococcus pyogenes* путей метаболизма аргинина в эукариотических клетках (система аргининдеиминазы)

Streptococcus pyogenes является возбудителем целого ряда тяжелых инфекционных заболеваний кожи и слизистых у человека, которые часто, при несвоевременной и неадекватной терапии антибиотиками, переходят в хроническую форму, приводя к тяжелым осложнениям с последующей инвалидизацией. В настоящее время у этих бактерий описано около 40 факторов патогенности, среди которых выделяют М и М-подобные белки, различные ферменты (стрептокиназу, гиалуронидазу, ДНКазу), токсины, повреждающие мембраны клеток (стрептолизин О и стрептолизин S), бактериальные суперантигены, ингибиторы системы комплемента [73] и др. Одним из важных факторов патогенности является фермент, гидролизующий аргинин — АД. АД *S. pyogenes* была впервые выделена из экстракта клеток *S. pyogenes* штамма Su, который обладал способностью подавлять рост различных трансформированных клеточных линий [116] и получила название кислый гликопротеин стрептококка (SAGP). Ген, кодирующий этот белок, был клонирован и экспрессирован в системе *E. coli* Kanaoka и соавторами [48]. Позднее было показано, что SAGP экспрессируют и некоторые другие штаммы *S. pyogenes*, а его аргининдеиминазная активность приводит к подавлению пролиферации Т-лимфоцитов человека [23].

Экспрессия АД *S. pyogenes* кодируется опероном ArgC, который состоит из трех ферментов: ArgA, ArgB, и ArgC, соответствующих АД, орнитинкарбамоилтрансферазе и карбаматкиназе [19] (рис. 2). Аргинин транспортируется в бактериальную клетку через антипортер ArgD и катаболизируется последовательно ферментами ArgA, ArgB и ArgC. АД — гидролаза, которая конвертирует аргинин в NH_3 и цитрулин. Образующийся цитрулин в свою очередь конвертируется орнитинкарбамоилтрансферазой в карбамоилфосфат и орнитин. Карбаматкиназа осуществляет перенос фосфатной группы с карбамоилфосфата на ADP, таким образом, синтезируются АТФ и NH_3 [18]. В результате из молекулы аргинина образуется одна молекула CO_2 , одна молекула АТФ и две молекулы NH_3 [19]. Предполагаемая роль системы АД состоит в обеспечении бактерий АТФ, биосинтезе цитрулина или пиримидинов, осуществляемом карбамоилфосфатазой,

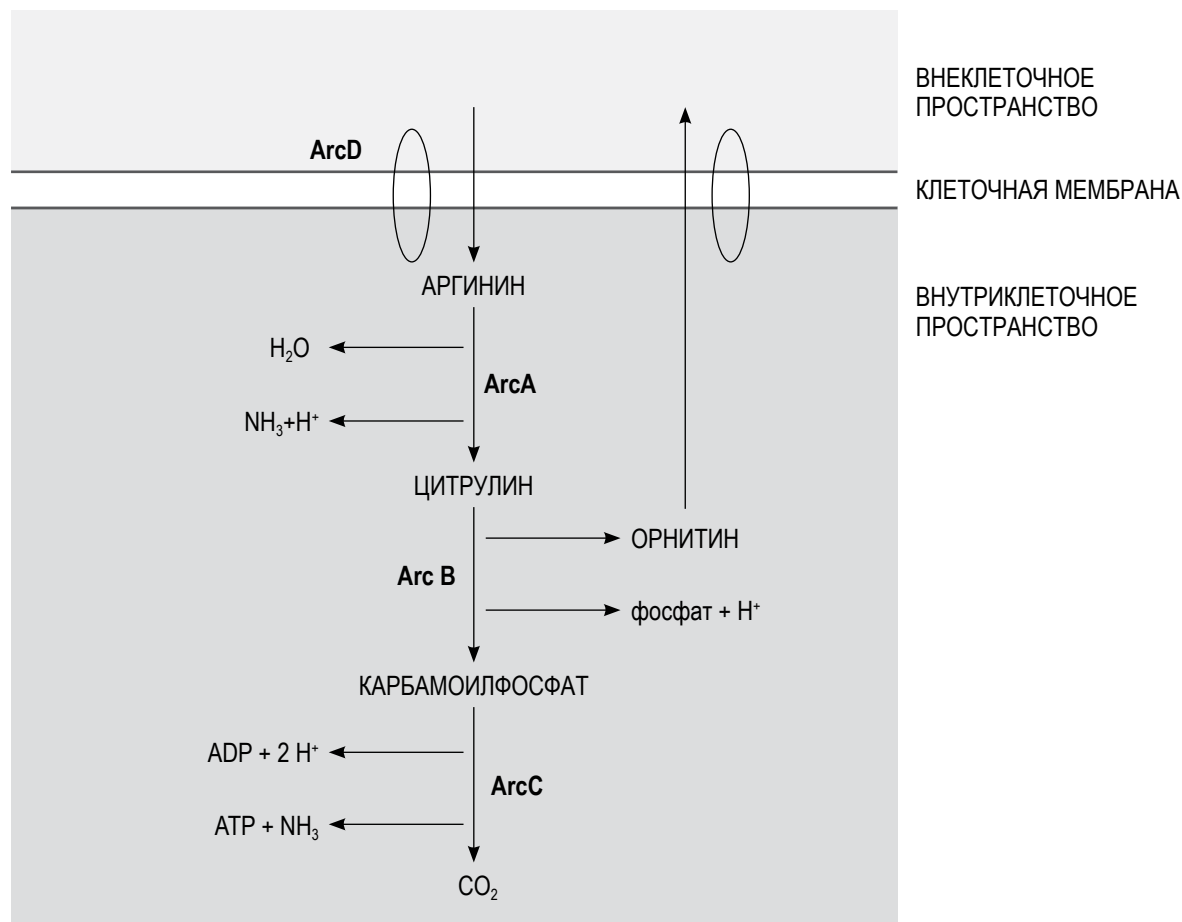


Рисунок 2. Катаболизм аргинина *S. pyogenes*

Примечание. Аргинин транспортируется в клетку через ArcD антипортер и катаболизируется последовательно ArcA (аргининдеиминаза), ArcB (орнитинкарбамоилтрансфераза) и ArcC (карбамакиназа) с продукцией одной молекулы CO₂, одной молекулы ATP и двух молекул NH₃ (из Zachary T. Cusumano, 2014 с изменениями).

а также в защите бактерий от кислой среды в очаге инфекции, благодаря продукции NH₃ [13, 18]. Degnan et al. с помощью мутационного анализа показали, что SAGP способствует выживанию *S. pyogenes* в кислой среде фаголизосомы [22]. SAGP *S. pyogenes* исходно был описан как цитозольный белок. Эта точка зрения основывалась на предполагаемых функциях АД и на способе выделения из клеточного экстракта [23, 117]. Недавно было показано, что ArcA *S. pyogenes*, M1T1, штамм 5448 (emm1) локализуется на поверхности бактериальных клеток [41]. Для АД из *S. suis*, с помощью иммуноэлектронной микроскопии и специфической антисыворотки против SAGP *S. pyogenes* было показано, что фермент ассоциирован с клеточной стенкой бактерий. Кроме того, в иммуноблоте АД из *S. suis* определялась в мембранной фракции. При этом секвенирование АД не выявило в структуре белка типичной сигнальной последовательности, характерной для секреторных и мембранных белков [110]. Эти данные показывают, что накопление АД в очаге

инфекции может происходить как благодаря разрушению бактериальных клеток под влиянием клеточных и гуморальных факторов организма-хозяина, так и в результате секреции бактериальными клетками фермента в окружающую среду. При этом клетки тканей и клетки иммунной системы будут испытывать действие этого фермента, которое, прежде всего, будет выражаться в деплеции условно незаменимой протеиногенной аминокислоты – аргинина.

Роль метаболизма аргинина в регуляции иммунного ответа

В настоящее время в литературе накоплено большое количество данных, доказывающих важную роль метаболизма аргинина в регуляции функций клеток иммунной системы. Большинство этих результатов получены в исследованиях по изучению дефицита аргинина, вызванного активностью аргиназ [9, 83]. Последствия депривации аргинина под влиянием АД для работы иммунной системы и осуществления защитных реакций организма-хозяина изучены недостаточ-

но подробно. Очевидно, что ограничение биодоступности аргинина должно, главным образом, изменять функции клеток, которые экспрессируют ферменты, метаболизирующие эту аминокислоту. Дефицит аргинина может также приводить изменению регуляторных функций этих клеток в отношении других клеток-мишеней.

Влияние дефицита аргинина на функции мононуклеарных фагоцитов

Моноциты и макрофаги представляют собой важный компонент врожденного иммунитета, т.е. первую линию защиты от патогенов. Макрофаги вовлечены в воспаление от стадии индукции до стадии разрешения и выполняют множество гомеостатических функций, включая ремоделирование тканей в эмбриогенезе, ранозаживление, а также регуляцию метаболической активности [114]. Аргиназа в миелоидных клетках гидролизует аргинин с образованием мочевины и орнитина, из которого осуществляется синтез полиаминов и пролина. Активность аргиназы в макрофагах обеспечивает процессы репарации тканей, благодаря генерации полиаминов, регулирующих пролиферацию клеток, и L-пролина аминокислоты входящей в состав коллагена [7]. Кроме того, активность аргиназы подавляет Т-клеточный ответ и способствует диссеминации патогенных микроорганизмов, за счет создания дефицита субстрата для iNOS и синтеза полиаминов. Активность iNOS, приводящая к продукции NO, напротив, оказывает антипролиферативное действие на клетки, активирует фагоцитоз, презентацию антигена, продукцию цитокинов, также обладает микробицидными эффектами [9, 43]. Поэтому дефицит этой молекулы приводит к неэффективности элиминации патогена в ходе бактериальной инфекции [9, 31, 35, 62]. NO участвует в регуляции адаптивного иммунного ответа, опосредованно через дифференцировку субпопуляций лимфоцитов, а также оказывает цитотоксическое действие благодаря разнообразным сигнальным функциям [9].

В клетках иммунной системы мышей экспрессия аргиназы и iNOS регулируется реципрокно, а поляризация метаболизма аргинина находится под контролем цитокинов: Th1-цитокины индуцируют экспрессию iNOS, в то время как Th2-цитокины индуцируют экспрессию аргиназы [114].

Несмотря на большое количество исследований, касающихся роли метаболизма аргинина в регуляции иммунного ответа у мышей, роль метаболизма этой аминокислоты для функций клеток иммунной системы человека остается слабо изученной. Данные об экспрессии ферментов, метаболизирующих аргинин, в моноцитах/макрофагах человека зачастую противоречат друг

другу, что, вероятно, связано с разными методами выделения, разной тканевой принадлежностью, а также с разными способами культивирования и активации этих клеток. Значительно отличаются и методы детекции ферментов, а именно — в разных исследованиях изучается их экспрессия на уровне РНК, на уровне белка или же биологическая активность [36, 94, 95, 101]. Более того, в литературе высказываются сомнения относительно важности этих ферментов как маркеров классической и альтернативной активации макрофагов человека [72]. Показано, что в моноцитах человека, в отличие от моноцитов мышей, экспрессия аргиназы под влиянием различных стимулов меняется незначительно [96]. Не исключено, что не только экспрессия аргиназы в клетках миелоидного ряда человека, но также ее функции значительно отличаются от таковых в клетках мыши [9, 101].

Деплеция аргинина вследствие активности АД может приводить к дефициту NO в ходе стрептококковой инфекции. В исследованиях *in vivo* было показано, что под влиянием АД происходит снижение концентрации аргинина в плазме крови и подавляется индуцированная под влиянием ЛПС продукция NO [74, 102]. В модели стрептококковой инфекции кожи на мышах на первый день инфицирования был выявлен высокий уровень экспрессии iNOS в тканях мыши. Однако деплеция аргинина *S. pyogenes* за счет активности АД подавляла продукцию NO, приводя к неэффективности iNOS. Дополнительным доказательством несостоятельности iNOS при стрептококковой инфекции было недостаточно значимое повышение вирулентности *S. pyogenes* у iNOS-дефицитных мышей по сравнению с контрольными животными. Эти данные говорят в пользу того, что при инфекции, вызванной *S. pyogenes* дикого типа, способность iNOS генерировать NO подавляется за счет деплеции субстрата для этого фермента [19]. Учитывая описанные выше отличия метаболизма аргинина в макрофагах мыши и человека, можно предположить, что последствия дефицита аргинина, вызванные активностью АД, при стрептококковой инфекции у человека будут отличаться от таковых у мыши.

Влияние дефицита аргинина на функции нейтрофилов

Среди всех клеток иммунной системы человека аргиназа I конститутивно и на высоком уровне экспрессируется в гранулоцитах. Однако, несмотря на высокую активность фермента, гранулоциты практически не метаболизируют внеклеточный аргинин для нужд клетки. Аргиназа локализуется в азурофильных гранулах клеток и оказывает антимикробное действие, приводя к деплеции аргинина в фаголизосомах [70]. Эти

данные подтверждают исследования Карр К. и др., в которых было показано, что функциональная активность нейтрофилов человека не изменяется при дефиците аргинина. В случае деплеции этой аминокислоты, вызванной активностью АД, не происходит изменения жизнеспособности, индуцированного синтеза IL-8, хемотаксиса, фагоцитоза, генерации активных форм кислорода и фунгицидной активности нейтрофилов *in vitro*. Кроме того, деплеция аргинина *in vivo* с помощью АД в комплексе с полиэтиленгликолем с молекулярной массой 20 кДа (ADPEG20) не подавляет функции полиморфноядерных лейкоцитов — инвазию в легкие, активацию, эффективность клиренса *Aspergillus fumigatus*, а также выживание мышей в модели инвазивного аспергиллеза легких [49].

Влияние дефицита аргинина на функции Т-лимфоцитов

Возможность экспрессии NOS Т-лимфоцитами является предметом дискуссии. Это связывают с методическими трудностями получения чистой популяции Т-лимфоцитов [9]. Роль метаболизма аргинина в индукции иммуносупрессии впервые была доказана именно в отношении Т-лимфоцитов. Было показано, что у онкологических больных наблюдается дисфункция иммунного ответа, которая проявляется в потере реакции гиперчувствительности замедленного типа. И хотя больные при этом не страдают оппортунистическими инфекциями, как пациенты с иммуносупрессией после высоких доз химиотерапии, для них характерно отсутствие Т-клеточного ответа против бактериальных и химических агентов [61, 108]. На основании этих фактов было сделано предположение, что опухоли обладают способностью подавлять Т-клеточный ответ. Результатом развернутых многолетних исследований в этой области стало открытие некоторых механизмов, лежащих в основе этой патологии, в том числе обнаружение популяции миелоидных супрессорных клеток [28, 80]. В экспериментах *in vitro* было показано, что именно макрофаги, экспрессирующие аргиназу I, но не макрофаги, экспрессирующие NOS2, при сокультивировании с Т-лимфоцитами, вызывают длительное подавление пролиферации этих клеток и снижение экспрессии CD3 ζ . Внесение в культуру ингибитора аргиназы или экзогенного аргинина отменяло эти эффекты [89]. А исследования на мышах, нокаутированных по аргиназе I (цитозольная форма) и аргиназе II (митохондриальная форма), подтвердили, что именно активность аргиназы I может приводит к истощению аргинина в сыворотке крови [24, 45].

Связь метаболизма аргинина с функциями Т-лимфоцитов была установлена и в экспери-

ментах, в которых было показано, что у мышей после массивного хирургического вмешательства наблюдается инволюция тимуса и снижение количества Т-лимфоцитов. Эти последствия отменялись в случае введения экзогенного аргинина. Культивирование Т-лимфоцитов в среде с концентрацией L-аргинина < 50 μ M приводило к существенному снижению пролиферации клеток, а Т-лимфоциты, активированные в культуральной среде, не содержащей аргинин, имели все изменения, ранее описанные у мышей с опухолями и онкологических больных (сниженную экспрессию (CD3 ζ) цепи Т-клеточного рецептора, снижение экспрессии тирозинкиназ p56lck, p59fyn, неспособность запускать Jak-3 внутриклеточный сигнальный путь и отсутствие транслокации транскрипционного фактора NFkB p65 в ядро [118]). При этом супрессорный эффект, индуцированный деплецией аргинина, не был связан со снижением трансдукции сигнала от Т-клеточного рецептора, т.к. Т-лимфоциты, активированные форбол 12-мирикат 13-ацетатом (без участия Т-клеточного рецептора) в отсутствие аргинина, тоже теряли способность пролиферировать [30, 64].

Экзогенный NO в низких концентрациях в комплексе с другими факторами оказывает модулирующее действие на пролиферацию и жизнеспособность Т-лимфоцитов, поддерживает выживание и дифференцировку Th1-, Th9- и Treg-лимфоцитов [9]. Данные относительно влияния NO на дифференцировку Th17 мыши и человека противоречивы. Показано, что у мышей экзогенный NO подавляет дифференцировку Th17 [56, 77, 115]. У человека экзогенный NO, напротив, необходим для дифференцировки RORgt⁺IL-23R⁺IL-17⁺ Th17-лимфоцитов из наивных CD4⁺Т-клеток. Более того, Th17-клетки человека, особенно клетки памяти, экспрессируют iNOS мРНК и белок, который индуцирует секрецию IL-17 и IL-23R [77].

Исследования В.А. Degnan показали, что SAGP, соответствующий АД, подавляет пролиферацию Т-лимфоцитов человека [23]. Основываясь на этих данных, можно предположить, что активность АД может не только приводить к дисрегуляции функций разных субпопуляций Т-лимфоцитов, но нарушать их дифференцировку.

Влияние дефицита аргинина на функции НК-клеток

Основной функцией НК-клеток является цитотоксичность в отношении инфицированных и трансформированных клеток, кроме того, НК-клетки участвуют в поляризации Т-лимфоцитов, созревании дендритных клеток и противовирусном иммунном ответе. В недавних исследованиях

было показано, что в отсутствие аргинина полностью блокируются экзоцитоз гранул и цитотоксичность НК-клеток, значительно подавляются секрета цитокинов и пролиферация, при одновременном снижении синтеза мРНК и экспрессии CD69. Если в Т-лимфоцитах в ответ на дефицит аргинина происходит фосфорилирование GCN2 киназы, то в НК-клетках, стимулированных IL-2 в отсутствие аргинина, этот внутриклеточный сигнальный путь остается незатронутым [76].

Влияние дефицита аргинина на функции В-лимфоцитов

Исследования, в ходе которых было показано, что аргинин необходим для антигенспецифической фазы развития В-клеток, указывают на способность АД подавлять развитие гуморального иммунного ответа. В работе de Jonge et al. использовали трансгенных мышей, с направленной сверхэкспрессией аргиназы I в энтероцитах [21]. Временное снижение уровня аргинина в плазме трансгенных мышей до 30-40% по сравнению с контрольными мышами, оказывало неблагоприятное влияние на кожу, мускулатуру и развитие лимфоидных органов, хотя эффект был в значительной степени ограничен первыми тремя неделями неонатального развития. Патология развития лимфоидных органов в основном проявлялась в уменьшении размеров Пейеровых бляшек, в лимфоидных тканях, ассоциированных с кишечником. Детальный анализ развития лимфоцитов у трансгенных мышей показал, что переход В-лимфоцитов из стадии про-В-лимфоцитов в стадию пре-В-лимфоцитов в костном мозге сильно зависит от биодоступности аргинина. У трансгенных мышей наблюдается обратное соотношение B220⁺/CD43⁺ про-В клеток к B220⁺/CD43⁻ пре-В клеткам, а блок дифференцировки про-В-лимфоцитов в пре-В-лимфоциты приводит к снижению жизнеспособности последних. У трансгенных мышей также выявляется понижение количества В клеток в селезенке, лимфатических узлах. Примечательно, что функция зрелых В-лимфоцитов оставалась незатронутой.

Нарушение дифференцировки В-клеток из про-В- в пре-В- было подтверждено с использованием проточной цитометрии, однако экспрессия пре-В-клеточного рецептора и трансдукция сигнала внутрь клетки от этого рецептора не изучались. Известно, что направленное выключение генов, кодирующих компоненты пре-В-клеточного рецептора или критические сигнальные молекулы от В-клеточного рецептора — Btk (Bruton's tyrosine kinase) или BLNK (B cell linker protein) нарушают развитие В-лимфоцитов так же, как это происходит у трансгенных мышей. Авторы предполагают, что снижение до-

ступности аргинина в микроокружении клеток костного мозга может приводить к изменению экспрессии генов, которые поддерживают развитие В-клеток, в про-В-/пре-В-клетках, или в клеточных компонентах стромы костного мозга [55].

Перитонеальные B1-клетки, IgD⁺B-клетки и B220^{low}CD138⁺ плазматические клетки мыши и человека экспрессируют изоформы iNOS и eNOS [91, 103]. Однако до сих пор не сложилось ясного представления о значении этого фермента для функциональной активности В-лимфоцитов. У мышей с дефицитом iNOS, инфицированных вирусом гриппа А, был выявлен высокий уровень вирус-специфических IgG2a по сравнению с контрольными мышами [47]. И эти данные противоречат исследованиям, в которых было показано, что у неинфицированных NOS 2-/- мышей наблюдается дефицит IgA в слезистых и IgG2b в сыворотке. В наивных IgD⁺B-клетках селезенки, мезентериальных лимфатических узлов или ламина проприа тонкого кишечника iNOS — дефицитных мышей наблюдаются серьезные нарушения Т-зависимого и Т-независимого переключения рекомбинации IgA и продукции IgA [100]. Примечательно, что iNOS не влияет на активацию (экспрессию CD69, MHCII класса и CD44) или пролиферацию В-клеток в ответ на ЛПС (Т-независимый-антиген) или анти-IgM стимуляцию [91].

Влияние дефицита аргинина на функции эндотелиальных клеток

Метаболизм аргинина играет важную роль в регуляции функций эндотелиальных клеток. NO, который генерирует eNOS, аутокринно действуя на эндотелиальные клетки, поддерживает гомеостаз кровеносных сосудов. Продуцируемый эндотелиальными клетками NO опосредует вазодилатацию, ограничивает воспаление, агрегацию тромбоцитов и пролиферацию гладкомышечных клеток. Исходя из важной роли, которую играет продукция эндогенного NO эндотелиальными клетками, утрата этой функции может способствовать развитию воспаления, тромбозов и эндотелиальной дисфункции [14].

Эндотелиальные клетки экспрессируют цитозольную и митохондриальную аргиназы, которые участвуют в регуляции функций сосудов. Благодаря синтезу полиаминов и пролина в результате активности этих ферментов осуществляется регуляция пролиферации гладкомышечных клеток и депозиции коллагена, а также ремоделирование сосудов [25, 57, 81].

Есть ряд данных, подтверждающих, что активность АД может приводить к развитию эндотелиальной дисфункции. Показано, что АД ингибирует функции эндотелиальных клеток, связанные с процессом ангиогенеза. Активность фермента

вызывает подавление миграции клеток вены пупочного канатика человека — HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells) в модели раны, формирование капилляроподобных структур *in vitro*, формирование новых сосудов в модели хориоалантоисной мембраны куриных эмбрионов *in vivo* [6, 78, 122]. Механизмы, лежащие в основе, выявленных изменений, остаются неизученными. Ряд исследований показывали, что NO может участвовать в регуляции ангиогенеза, модулируя активность VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor) и металлопротеаз матрикса [70, 77, 103, 120]. Предположительно, высокие и низкие концентрации NO могут индуцировать гибель эндотелиальных клеток, в то время как базальная концентрация NO ингибирует их апоптоз, вызванный H_2O_2 , TNF α , окисленными липопротеинами низкой плотности либо дефицитом сыворотки [33].

Известно, что эндотелиальные клетки могут длительно поддерживать эндогенный уровень аргинина, за счет его ресинтеза из цитрулина [14]. В исследованиях I.-S. Park (2003) было показано, что дефицит продукции NO в результате дефицита аргинина не оказывает значимого влияния на процесс ангиогенеза [79]. Очевидно, что эффективность механизма ресинтеза аргинина связана со скоростью его гидролиза, с одной стороны, и со скоростью ресинтеза, с другой. Цитрулин является продуктом гидролиза аргинина как под действием NOS, так и АД. Эукариотические клетки, которые экспрессируют ферменты цикла мочевого кислоты — АСС и АСЛ и транспортеры этой аминокислоты, способны ресинтезировать аргинин из цитрулина. Хотя АСС и АСЛ обнаруживаются во всех тканях, высокий уровень их экспрессии характерен только для клеток печени и почек [3]. В эндотелиальных клетках и макрофагах оба фермента вместе с NOS являются частью цикла NO-цитрулин, в котором цитрулин конвертируется в аргинин с последующей генерацией NO [33]. Показано, что в эндотелиальных клетках все три фермента коэкспрессируются в кавеолах на мембране клеток [14]. Изучение врожденных дефектов АСЛ подтверждает, что активный фермент необходим для продукции NO. Терапия с использованием доноров NO приводит к устранению клинических признаков гипертонии у детей с врожденным дефицитом АСЛ [26]. Экспрессию АСС клетками печени регулирует cAMP [37], а экспрессию АСС эндотелиальными клетками регулируют цитокины IL-1, TNF α , и TGF- β и глутамат [10].

Примечательно, что в макрофагах процесс ресинтеза аргинина из цитрулина является неэффективным [4, 38, 113], следовательно, эти клет-

ки должны быть более чувствительны к дефициту аргинина.

Механизмы дисрегуляции функций клеток в результате дефицита аргинина

Аминокислотное голодание

Длительный, до 6 суток, дефицит аргинина приводит к гибели клеток в культуре [52]. Считается, что аргинин — одна из двух аминокислот (вторая — лейцин), которые влияют на экспрессию mTOR (mammalian target of rapamycin)-серинтреонин протеинкиназы, которая регулирует синтез белка, пролиферацию и жизнеспособность клеток [27]. Это объясняет способность факторов, приводящих к деплеции аргинина подавлять синтез белка в клетке [54, 82]. С участием аргинина происходит посттрансляционное аргинилирование белков [90]. Перенос аргинина с заряженной тРНК на N-терминальный участок Asp, Glu и Cys белков аргинилтрансферазой модифицирует белки для деградации [99]. Исследование механизмов Т-клеточной супрессии показало, что дефицит аргинина, вызванный действием аргиназ, приводит к активации GCN2 (general control nondepressible 2) киназы в Т-клетках и аресту клеточного цикла. Цитоплазматическая GCN2 киназа активируется в присутствии незаряженных тРНК, фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 α по Ser51, что приводит к глобальной ингибции трансляции в клетке [87, 106, 107]. В активированных Т-клетках в отсутствие аргинина происходит значительное повышение уровня фосфорилирования eIF2 α [69].

Дефицит аргинина приводит к снижению уровня мРНК циклина D3, а также снижению ее стабильности, блокирует транслокацию D3 в ядро. В клетках млекопитающих, циклин-зависимые киназы cdk4 и cdk6 ассоциированы с циклинами D-типа (D1, D2, и D3) и регулируют прохождение клетки через G₁ фазу в S фазу клеточного цикла. На мышцах, нокаутированных по гену циклина D3, было показано, что он необходим для созревания и для пролиферации Т-клеток в тимусе. Т-клетки, культивируемые в отсутствие L-Arg, вследствие ингибции циклина D3, имели значительно сниженный уровень фосфорилирования pRb и низкий уровень ядерной транслокации транскрипционного фактора E2F-1 [65, 83].

Депривация аминокислот вообще приводит к пищевому голоданию. В случае пищевого стресса, чтобы предотвратить апоптоз, в клетках запускаются процессы автофагии, что позволяет реутилизировать аминокислоты белков, подвергшихся деградации. Активность АД в комплексе с полиэтиленгликолем с молекулярным весом 20 кДа (АД-PEG20) приводит к снижению экспрессии mTOR (mammalian target of rapamycin)

в опухолевых клетках, не экспрессирующих ACC1, и модулирует PI₃K (phosphoinositide 3-kinase) опосредованно через супрессию PTEN (phosphatase and tensin homolog) [82]. На модели рака простаты было показано, что глобальный метаболический стресс в клетках регистрируется уже через 4 часа после введения АД-PEG20. При этом в ACC-негативных клетках, обработанных АД-PEG20, происходит активация внутриклеточных сигнальных путей, с вовлечением AMPK (AMP activated protein kinase)/mTOR/S6K (ribosomal s6 kinase), приводящая к индукции аутофагии, что позволяет клеткам компенсировать дефицит аминокислоты [50, 93].

Дефицит NO

Хорошо известно, что дефицит субстрата NOS не только приводит к снижению продукции NO, но также переключает NOS в сторону преимущественно продукции O₂⁻ [12, 15]. Когда концентрация аргинина субоптимальна, редуктазный и оксигеназный домены NOS осуществляют перенос электронов на косубстрат O₂ с продукцией O₂⁻, который в свою очередь взаимодействует с другими молекулами с образованием активных форм азота (RNS) и активных форм кислорода (ROS), таких как пероксинитрит (ONOO⁻) и пероксид водорода (H₂O₂) соответственно. Эти молекулы оказывают множественное действие на различные процессы в клетках. Пероксинитрит – RNS, который образуется, как продукт реакции между O₂⁻ и NO, высокоактивная молекула, способная повреждать биологические молекулы и проникать через мембрану клеток быстрее, чем разлагаться. Пероксинитрит вызывает посттрансляционные модификации белков за счет нитрации тирозиновых остатков белков и может являться сигнальной молекулой. Пероксинитрит вызывает активацию или деактивацию ферментов, регулирует клеточную дифференцировку и пролиферацию. Причем эти эффекты могут быть обратимыми, т.к. белки, подвергшиеся нитрации, могут стать мишенями протеолитической деградации или подвергнуться денитрации [11]. Внеклеточный пероксинитрит может тоже приводить к апоптотической гибели клеток за счет нитрации потенциал-зависимых анионных каналов, что вызывает повреждение митохондрий и высвобождает проапоптотические факторы, такие как цитохром C [2]. В результате дисмутирования O₂⁻ образуется H₂O₂. Пероксид водорода электро-нейтральная молекула, которая свободно проникает через клеточную мембрану и является внутриклеточным мессенджером. Так же как пероксинитрит, H₂O₂ может направленно индуцировать апоптоз активированных Т-клеток, снижая экспрессию внутриклеточного антиапоптотического белка BCL-2 и повышая

уровень экспрессии CD95L (лиганда FAS) через NF-κB-сигнальный путь [11]. Генерация активных форм кислорода, а также пероксинитрита является сигналом, индуцирующим секрецию провоспалительных цитокинов в результате активации инфламмасом [40], который ввиду супрессии других звеньев иммунной системы, вызванной дефицитом аргинина, может приводить к еще большей дисрегуляции иммунного ответа и его неэффективности.

Дефицит полиаминов

Предметом отдельного направления исследований может быть вопрос о том, как катаболизм аргинина под влиянием бактериальной АД может изменять продукцию полиаминов эукариотическими клетками. Полиамины – малые органические поликатионы, для образования которых необходим гидролиз аргинина аргиназами. Предполагают, что они играют важную роль для таких фундаментальных клеточных процессов, как сигналинг, репликация, транскрипция и трансляция [58, 68]. Аргинин конвертирует в полиамины спермидинсинтаза. Следующий этап продукции полиаминов состоит в продукции спермина с участием сперминсинтазы. Необходимость полиаминов для пролиферации клеток подтверждает тот факт, что α-дифлуорометилорнитин, ингибитор орнитиндекарбоксилазы, фермента, замедляющего скорость биосинтеза полиаминов, подавляет пролиферацию клеток вены пупочного канатика человека – HUVEC [97]. Полиамины обладают способностью связываться с ДНК и работают как промоторы рибосомальной рамки считывания в процессе трансляции [79, 88]. Полиамины регулируют элонгацию трансляции, модулируя фосфорилирование двух ключевых регуляторов процесса инициации трансляции eIF2 и 4E-BP1 [53]. eIF5A служит фактором элонгации трансляции в клетках млекопитающих и необходим для их пролиферации. eIF5A является высококонсервативным незаменимым белком и содержит необычный аминокислотный остаток, производный спермидина – гипусин, определяющий его биологическую активность. Полиамины осуществляют гипусинацию eIF5A [53].

Полиамины индуцируют процессы аутофагии, поэтому деплеция аргинина в качестве субстрата для аргиназы, вызывающая дефицит полиаминов, может приводить к невозможности реутилизировать эндогенные аминокислоты и снижать жизнеспособность клеток [111].

Дефицит пролина

Аргинин также является субстратом для синтеза пролина, который в свою очередь служит незаменимой аминокислотой для синтеза коллагена [66], поэтому дефицит аргинина в качестве субстрата аргиназы может приводить к наруше-

нию процессов регенерации и развитию хронического воспалительного процесса [85, 112].

Генерация аммиака

Исследования Degnan В.А. показали, что в присутствии АД не удастся восстановить уровень пролиферации эндотелиальных клеток до уровня пролиферации клеток в стандартных условиях добавлением экзогенного аргинина [23]. Это можно объяснить только тем, что в результате гидролиза аргинина под влиянием АД в среде происходит накопление его токсичного метаболита NH_3 [51, 63, 79]. Известно, что NH_3 оказывает нейротоксическое действие при метаболических расстройствах разного рода, сопровождающихся гипераммониемией, включая печеночную энцефалопатию, нейропсихиатрический синдром и дефицит ферментов цикла мочевой кислоты, когда концентрация NH_3 может достигать 5 mM. Метаболическое действие нейротоксичности аммиака связано с изменением уровня секреции ROS и RNS, метаболизма NO, уровня cAMP, MAPK-киназного сигнального пути, структуры цитоскелета. Токсическое действие NH_3 на клетки приводит к усилению продукции TNF α и IL-1 β , которые в свою очередь индуцируют продукцию ROS, активацию PKA, ERK и NF- κ B [8, 75]. Нельзя исключать, что NH_3 , генерируемый в результате активности АД, будет оказывать схожее токсическое действие на другие типы клеток.

Заключение

Бактериальная АД способствует улучшению выживаемости патогенных бактерий в условиях пониженной кислотности в очаге инфекции или в фаголизосомах благодаря генерации NH_3 , а также в анаэробных условиях за счет генерации АТР. На модели стрептококковой инфекции у мышей было показано, что в крови животных вследствие активности АД наблюдается снижение концентрации аргинина. Метаболизм аргинина является одним из важных механизмов регуляции и ограничения развития иммунного ответа. Получены многочисленные данные, доказывающие важную роль метаболитов аргинина для работы клеток иммунной системы. Важно подчеркнуть, что основные исследования в этой области сделаны на мышах, у которых патогенные стрептококки в естественных условиях не вызывают инфекции. Очевидным является существование отличий регуляции метаболизма аргинина в клетках мыши и человека. В связи с этим, необходимы дальнейшие исследования по конкретизации патогенетической роли АД в развитии стрептококковой инфекции, выявлению действия этого фермента на работу иммунной системы человека на локальном и системном уровне, и уточнению механизмов действия этого фермента.

Список литературы / References

1. Amber I.J., Hibbs J.B.Jr., Parker C.J., Johnson B.B., Taintor R.R., Vavrin Z. Activated macrophage conditioned medium: identification of the soluble factors inducing cytotoxicity and the L-arginine dependent effector mechanism. *J. Leukoc. Biol.*, 1991, Vol. 49, no. 6, pp. 610-620.
2. Aulak K.S., Miyagi M., Yan L., West K.A., Massillon D., Crabb J.W., Stuehr D.J. Proteomic method identifies proteins nitrated *in vivo* during inflammatory challenge. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 2001, Vol. 98, pp. 12056-12061.
3. Bahri S., Zerrouk N., Aussel C., Moineau C., Crenn P., Curis E., Chaumeil J.C., Cynober L., Sfar S. Citrulline: from metabolism to therapeutic use. *Nutrition*, 2013, Vol. 29, no. 3, pp. 479-484.
4. Baydoun A.R., Bogle R.G., Pearson J.D., Mann G.E. Discrimination between citrulline and arginine transport in activated murine macrophages: inefficient synthesis of NO from recycling citrulline to arginine. *Br. J. Pharmacol.*, 1994, Vol. 112, pp. 487-492.
5. Baylis C. Nitric oxide deficiency in chronic kidney disease. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2008, Vol. 294, Vol. 1, pp. 1-9.
6. Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a potential anti-angiogenic agent. *Cancer. Lett.*, 2002, Vol. 183, Vol. 2, pp. 155-162.
7. Biswas S.K., Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.*, 2012, Vol. 15, no. 4, pp. 432-437.
8. Bobermin L.D., Quincozes-Santos A., Guerra M.C., Leite M.C., Souza D.O., Goncalves C.-A., Gottfried C. Resveratrol Prevents Ammonia Toxicity in Astroglial Cells. *PLOS.*, 2012, Vol. 7, e52164.
9. Bogdan C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: an update. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 3, pp. 161-178.
10. Brasse-Lagnel C., Fairand A., Lavoigne A., Husson A. Glutamine stimulates argininosuccinate synthetase gene expression through cytosolic O-glycosylation of Sp1 in Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 52504-52510.
11. Bronte V., Zanovello P. Regulation of immune responses by L-arginine metabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, no. 8, pp. 641-654.
12. Bronte V., Serafini P., De Santo C., Marigo I., Tosello V., Mazzoni A., Segal D.M., Staib C., Lowel M., Sutter G., Colombo M.P., Zanovello P. IL-4-induced arginase 1 suppresses alloreactive T cells in tumor-bearing mice. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, pp. 270-278.

13. Casiano-Colon A., Marquis R.E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, Vol. 54, no. 6, pp. 1318-1324.
14. Chen F., Lucas R., Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, no. 184.
15. Closs E.I., Simon A., Vekony N., Rotmann A. Plasma membrane transporters for arginine. *J. Nutr.*, 2004, Vol. 134, no. 10, pp. 2752S-2759.
16. Cole C., Thomas S., Filak H., Henson P.M., Lenz L.L. Nitric oxide increases susceptibility of toll-like receptor-activated macrophages to spreading *Listeria monocytogenes*. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 5, pp. 807-820.
17. Cullen M.E., Yuen A.H., Felkin L.E., Smolenski R.T., Hall J.L., Grindle S., Miller L.W., Birks E.J., Yacoub M.H., Barton P.J. Myocardial expression of the arginine:glycine amidinotransferase gene is elevated in heart failure and normalized after recovery: potential implications for local creatine synthesis. *Circulation*, 2006, Vol. 114, pp. 16-20.
18. Cunin R.N., Glansdorff A.P., Stalon V. Biosynthesis and metabolism of arginine in bacteria. *Microbiol. Rev.*, 1986, Vol. 50, pp. 314-352.
19. Cusumano Z.T., Watson M.E.Jr., Caparon M.G. *Streptococcus pyogenes* arginine and citrulline catabolism promotes infection and modulates innate immunity. *Infect. Immun.*, 2014, Vol. 82, no. 1, pp. 233-242.
20. Das P., Lahiri A., Lahiri A. and Chakravorty D. Modulation of the Arginase Pathway in the Context of Microbial Pathogenesis: A Metabolic Enzyme Moonlighting as an Immune Modulator. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 6.
21. de Jonge W.J., Kwikkers K.L., te Velde A.A., van Deventer S.J., Nolte M.A., Mebius R.E., Ruijter J.M., Lamers M.C., Lamers W.H. Arginine deficiency affects early B cell maturation and lymphoid organ development in transgenic mice. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, no. 10, pp. 1539-1548.
22. Degnan B.A., Fontaine M.C., Doebereiner A.H., Lee J.J., Mastroeni P., Dougan G., Goodacre J.A., Kehoe M.A. Characterization of an isogenic mutant of *Streptococcus pyogenes* Manfredo lacking the ability to make streptococcal acid glycoprotein. *Infect. Immun.*, 2000, Vol. 68, no. 5, pp. 2441-2448.
23. Degnan B.A., Palmer J.M., Robson T., Jones C.E., Fischer M., Glanville M., Mellor G.D., Diamond A.G., Kehoe M.A., Goodacre J.A. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity. *Infect Immun.*, 1998, Vol. 66, no. 7, pp. 3050-3058.
24. Deignan J.L., Livesay J.C., Yoo P.K., Goodman S.I., O'Brien W.E., Iyer R.K., Cederbaum S.D., Grody W.W. Ornithine deficiency in the arginase double knockout mouse. *Mol. Genet. Metab.*, 2006, Vol. 89, pp. 87-96.
25. Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, no. 111.
26. Erez A. Argininosuccinic aciduria: from a monogenic to a complex disorder. *Genet. Med.* 2013, Vol. 15, no. 4, pp. 251-257.
27. Fingar D.C., Richardson C.J., Tee A.R., Cheatham L., Tsou C., Blenis J. mTOR Controls Cell Cycle Progression through Its Cell Growth Effectors S6K1 and 4E-BP1/Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E. *Molecular and Cellular Biology*, 2004, Vol. 24, no. 1, pp. 200-216.
28. Gabrilovich D. Mechanisms and functional significance of tumour-induced dendritic-cell defects. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, pp. 941-952.
29. Gabrilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 3, pp. 162-174.
30. Ghosh P., Sica A., Young H.A., Ye J., Franco J.L., Wiltout R.H., Longo D.L., Rice N.R., Komschlies K.L. Alterations in NF kappa B/Rel family proteins in splenic T-cells from tumor-bearing mice and reversal following therapy. *Cancer Res.*, 1994, Vol. 54, pp. 2969-2972.
31. Goldmann O., Rohde M., Chhatwal G.S., Medina E. Role of macrophages in host resistance to group A streptococci. *Infect. Immun.*, 2004, Vol. 72, pp. 2956-2963.
32. Gong H., Zolzer F., von Recklinghausen G., Havers W., Schweigerer L. Arginine deiminase inhibits proliferation of human leukemia cells more potently than asparaginase by inducing cell cycle arrest and apoptosis. *Leukemia*, 2000, Vol. 14, pp. 826-829.
33. Goodwin B.L., Solomonson L.P., Eichler D.C. Argininosuccinate Synthase Expression Is Required to Maintain Nitric Oxide Production and Cell Viability in Aortic Endothelial Cells. *J. Biol Chem.*, 2004, Vol. 279, no. 18, pp. 18353-18360.
34. Gordon S., Taylor P.R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nature Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 5, pp. 953-964.
35. Granger D.L., Hibbs J.B., Perfect Jr.J.R., Durack D.T. Specific amino acid (L-arginine) requirement for the microbiostatic activity of murine macrophages. *J. Clin. Invest.*, 1988, Vol. 81, no. 4, pp. 1129-1136.
36. Gross T.J., Kremens K., Powers L.S., Brink B., Knutson T., Domann F.E. Epigenetic silencing of the human NOS2 gene: rethinking the role of nitric oxide in human macrophage inflammatory responses. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 5, pp. 2326-2338.
37. Guei T.R., Liu M.C., Yang C.P., Su T.S. Identification of a liver-specific cAMP response element in the human argininosuccinate synthetase gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2008, Vol. 377, pp. 257-261.
38. Hammermann R., Bliesener N., Mossner J., Klasen S., Wiesinger H., Wessler I., Race K. Inability of rat alveolar macrophages to recycle L-citrulline to L-arginine despite induction of argininosuccinate synthetase mRNA

and protein, and inhibition of nitric oxide synthesis by exogenous L-citrulline. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, 1998, Vol. 358, pp. 601-607.

39. Hecker M., Sessa W.C., Harris H.J., Anggard E.E., Vane J.R. The metabolism of L-arginine and its significance for endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, pp. 8612-8616.

40. Heid M.E., Keyel P.A., Kamga C., Shiva S., Watkins S.C., Salter R.D. Mitochondrial reactive oxygen species induces NLRP3-dependent lysosomal damage and inflammasome activation. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, no. 10, pp. 5230-5238.

41. Henningham A., Ericsson D.J., Langer K., Casey L.W., Jovceviski B., Chhatwal G.S., Aquilina J.A., Batzloff M.R., Kobe B., Walker M.J. Structure-informed design of an enzymatically inactive vaccine component for group A Streptococcus. *M. Bio*, 2013, Vol. 4, no. 4.

42. Hibbs J.B.Jr., Vavrin Z., Taintor R.R. L-arginine is required for expression of the activated macrophage effector mechanism causing selective metabolic inhibition in target cells. *J. Immunol.*, 1987, Vol. 138, no. 2, pp. 550-565.

43. Hibbs J.B.Jr., Taintor R.R., Vavrin Z., Rachlin E.M. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1988, Vol. 157, pp. 87-94.

44. Item C.B., Stockler-Ipsiroglu S., Stromberger C., Muhl A., Alessandri M.G., Bianchi M.C., Tosetti M., Fornai F., Cioni G. Arginine:glycine amidinotransferase deficiency: the third inborn error of creatine metabolism in humans. *Am. J. Hum. Genet.* 2001, Vol. 69, no. 5, pp. 1127-1133.

45. Iyer R.K., Yoo P.K., Kern R.M., Rozengurt N., Tsoa R., O'Brien W.E., Yu H., Grody W.W., Cederbaum S.D. Mouse model for human arginase deficiency. *Mol. Cell. Biol.*, 2002, Vol. 22, no. 13, pp. 4491-4498.

46. Iyo A.H., Zhu M.Y., Ordway G.A., Regunathan S. Expression of arginine decarboxylase in brain regions and neuronal cells. *J. Neurochem.*, 2006, Vol. 96, no. 4, pp. 1042-1050.

47. Jayasekera J.P., Vinuesa, C.G., Karupiah, G., King, N.J.C. Enhanced antiviral antibody secretion and attenuated immunopathology during influenza virus infection in nitric oxide synthase-2-deficient mice. *J. Gen. Virol.*, 2006, no. 87, pp. 3361-3371.

48. Kanaoka M., Kawanaka T.C., Negoro Y., Fukita K.T., Agui H. Cloning and expression of the antitumor glycoprotein gene of Streptococcus pyogenes Su in Escherichia coli. *Agric. Biol. Chem.*, 1987, Vol. 51, pp. 2641-2648.

49. Kapp K., Prufer S., Michel C.S., Habermeier A., Luckner-Minden C., Giese T., Bomalaski J., Langhans C.D., Kropf P., Muller I., Closs E.I., Radsak M.P., Munder M. Granulocyte functions are independent of arginine availability. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, Vol. 96, no. 6, pp. 1047-1053.

50. Kim R.H., Coates J.M., Bowles T.L., McNerney G.P., Sutcliffe J., Jung J.U., Gandour-Edwards R., Chuang F.Y., Bold R.J., Kung H.J. Arginine deiminase as a novel therapy for prostate cancer induces autophagy and caspase-independent apoptosis. *Cancer Res.*, 2009, Vol. 69, pp. 700-708.

51. Komada Y., Zhang X.L., Zhou Y.W., Ido M., Azuma E. Apoptotic cell death of human T lymphoblastoid cells induced by arginine deiminase. *Int. J. Hematol.*, 1997, Vol. 65, no. 2, pp. 129-141.

52. Kuo M.T., Savaraj N., Feun L.G. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *Oncotarget.*, 2010, Vol. 1, no. 4, pp. 246-251.

53. Landau G., Bercovich Z., Park M.H., Kahana C. The Role of Polyamines in Supporting Growth of Mammalian Cells Is Mediated through Their Requirement for Translation Initiation and Elongation. *Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, no. 17, pp. 12474-12481.

54. Laplante M., Sabatini D.M. mTOR signaling in growth control and disease. *Cell*, 2014, Vol. 149, pp. 274-293.

55. LeBien T.W. Arginine: an unusual dietary requirement of pre-B lymphocytes? *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 11, pp. 1411-1413.

56. Lee S.W., Heonsik C., Eun S.-Y., Fukuyama S., Croft M. Nitric oxide modulates TGF-beta-directive signals to suppress Foxp3+ regulatory T cell differentiation and potentiate Th1 development. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 6972-6980.

57. Li H., Meininger C.J., Hawker J.R.Jr, Haynes T.E., Kepka-Lenhart D., Mistry S.K. Regulatory role of arginase I and II in nitric oxide, polyamine, and proline syntheses in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2001, Vol. 280, no. 1, pp. 75-82.

58. Li H., Meininger C.J., Kelly K.A., Hawker J.R. Jr, Morris S.M. Jr, Wu G. Activities of arginase I and II are limiting for endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 2002, Vol. 282, no. 1, pp. 64-69.

59. Mattila J.T., Thomas A.C. Nitric oxide synthase: non-canonical expression patterns. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 9, no. 5, p. 478.

60. Miescher S., Whiteside T.L., Carrel S., von Flidner V. Functional properties of tumor-infiltrating and blood lymphocytes in patients with solid tumors: effects of tumor cells and their supernatants on proliferative responses of lymphocytes. *J. Immunol.*, 1986, Vol. 136, pp. 1899-1907.

61. Mishalian I., Ordan M., Peled A., Maly A., Eichenbaum M.B., Ravins M., Aychek T., Jung S., Hanski E. Recruited macrophages control dissemination of group A streptococcus from infected soft tissues. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, pp. 6022-6031.

62. Miyazaki K., Takaku H., Umeda M., Fujita T., Huang W., Kimura T., Yamashita J. and Horio T. Potent Growth Inhibition of Human Tumor Cells in Culture by Arginine Deiminase Purified from a Culture Medium of a Mycoplasma-infected Cell Line. *Cancer Research*, 1990, Vol. 50, pp. 4522-4527.

63. Mizoguchi H., O'Shea J.J., Longo D.L., Loeffler C.M., McVicar D.W., Ochoa A.C. Alterations in signal transduction molecules in T lymphocytes from tumor-bearing mice. *Science*, 1992, Vol. 258, pp. 1795-1798.
64. Morris S.M.Jr. Arginases and arginine deficiency syndromes. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2012, Vol. 15, no. 1, pp. 64-70.
65. Morris S.M.Jr. Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases. *British Journal of Pharmacology*, 2009, Vol. 157, no. 6, pp. 922-930.
66. Morris S.M.Jr. Regulation of enzymes of the urea cycle and arginine metabolism. *Annu. Rev. Nutr.*, 2002, Vol. 22, pp. 87-105.
67. Morrison R.F., Seidel E.R. Vascular endothelial cell proliferation: regulation of cellular polyamines. *Cardiovasc. Res.*, 1995, Vol. 29, no. 6, pp. 841-847.
68. Morrow K., Hernandez C.P., Raber P., Del Valle L., Wilk A.M., Majumdar S., Wyczzechowska D., Reiss K., Rodriguez P.C. Anti-leukemic mechanisms of pegylated arginase I in acute lymphoblastic T-cell leukemia. *Leukemia*, 2013, Vol. 27, no. 3, pp. 569-577.
69. Munder M., Mollinedo F., Calafat J., Canchado J., Gil-Lamaignere C., Fuentes J.M., Luckner C., Doschko G., Soler G., Eichmann K., Muller F.M., Ho A.D., Goerner M., Modolell M. Arginase I is constitutively expressed in human granulocytes and participates in fungicidal activity. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 6, pp. 2549-2556.
70. Murohara T., Asahara T., Silver M., Bauters C., Masuda H., Kalka C., Kearney M., Chen D., Symes J.F., Fishman M.C., Huang P.L., Isner J.M. Nitric oxide synthase modulates angiogenesis in response to tissue ischemia. *J. Clin. Invest.*, 1998, Vol. 101, pp. 2567-2578.
71. Murray P.J., Wynn T.A. Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.*, 2011, Vol. 89, no. 4, pp. 557-563.
72. Nobbs A.H., Lamont R.J., Jenkinson H.F. Streptococcus Adherence and Colonization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2009, Vol. 73, no. 3, pp. 407-450.
73. Noh E.J., Kang S.W., Shin Y.J., Kim D.C., Park I.S., Kim M.Y., Chun B.G., Min B.H. Characterization of mycoplasma arginine deiminase expressed in E. coli and its inhibitory regulation of nitric oxide synthesis. *Mol. Cells*, 2002, Vol. 28, no. 13, no. 1, pp. 137-143.
74. Norenberg M.D. Oxidative and nitrosative stress in ammonia neurotoxicity. *Hepatology*, 2003, Vol. 37, pp. 245-248.
75. Oberlies J., Watzl C., Giese T., Luckner C., Kropf P., Müller I., Ho A.D., Munder M. Regulation of NK cell function by human granulocyte arginase. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 9, pp. 5259-5267.
76. Obermajer N., Wong J.L., Edwards R.P., Chen K., Scott M., Khader S., Kolls J.K., Kunle Odunsi, Billiar T.R. and Kalinski P. Induction and stability of human Th17 cells require endogenous NOS2 and cGMP-dependent NO signaling. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, pp. 1433-1445.
77. Papapetropoulos A., Garcia-Cardena G., Madri J.A., Sessa W.C. Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *J. Clin. Invest.*, 1997, Vol. 100, no. 12, pp. 3131-3139.
78. Park I.-S., Kang S.-W., Shin Y.-J., Chae K.-Y., Park M.-O., Kim M.-Y., Wheatley D.N., Min B.-H. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *British Journal of Cancer*, 2003, Vol. 89, pp. 907-914.
79. Pekarek L.A., Starr B.A., Toledano A.Y., Schreiber H. Inhibition of tumor growth by elimination of granulocytes. *J. Exp. Med.*, 1995, Vol. 181, pp. 435-440.
80. Pernow J., Jung C. Arginase as a potential target in the treatment of cardiovascular disease: reversal of arginine steal? *Cardiovasc. Res.*, 2013, Vol. 98, no. 3, pp. 334-343.
81. Phillips M.M., Sheaff M.T., Szlosarek P.W. Targeting arginine-dependent cancers with arginine-degrading enzymes: opportunities and challenges. *Cancer Res. Treat.*, 2013, Vol. 45, no. 4, pp. 251-562.
82. Raber P., Ochoa A.C., Rodriguez P.C. Metabolism of L-Arginine by Myeloid-Derived Suppressor Cells in Cancer: Mechanisms of T cell suppression and Therapeutic Perspectives. *Immunol. Invest.*, 2012, Vol. 41, no. 6-7, pp. 614-634.
83. Rabier D., Kamoun P. Metabolism of citrulline in man. *Amino Acid.*, 1995, Vol. 9, pp. 299-316.
84. Racke K., Warnken M. L-Arginine Metabolic Pathways. *The Open Nitric Oxide Journal*, 2010, Vol. 2, pp. 9-19.
85. Rajman L. Citrulline synthesis in rat tissues and liver content of carbamoyl phosphate and ornithine. *Biochem. J.*, 1974, Vol. 138, pp. 225-232.
86. Ramirez M., Wek R.C., Vazquez de Aldana C.R., Jackson B.M., Freeman B., Hinnebusch A.G. Mutations activating the yeast eIF-2 alpha kinase GCN2: isolation of alleles altering the domain related to histidyl-tRNA synthetases. *Mol. Cell. Biol.*, 1992, Vol. 12, no. 12, pp. 5801-5815.
87. Rato C., Amirova S.R., Declan G.B., Stansfield I., Wallace H.M. Translational recoding as a feedback controller: systems approaches reveal polyamine-specific effects on the antizyme ribosomal frameshift. *Nucleic Acids Res.*, 2011, Vol. 39, no. 11, pp. 4587-4597.
88. Rodriguez P.C., Zea A.H., DeSalvo J., Culotta K.S., Zabaleta J., Quiceno D.G., Ochoa J.B., Ochoa A.C. L-arginine consumption by macrophages modulates the expression of CD3 zeta chain in T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 3, pp. 1232-1239.

89. Saha S., Kashina A. Posttranslational Arginylation as a Global Biological Regulator. *Dev. Biol.*, 2011, Vol. 358, no. 1, pp. 1-8.
90. Saini A.S., Shenoy G.N., Rath S., Bal V., George A. Inducible nitric oxide synthase is a major intermediate in signaling pathways for the survival of plasma cells. *Nat. Immunol.*, 2014, Vol. 15, pp. 275-282.
91. Santhanam L., Lim H.K., Lim H.K., Miriel V., Brown T., Patel M., Balanson S., Ryoo S., Anderson M., Irani K., Khanday F., Di Costanzo L., Nyhan D., Hare J.M., Christianson D.W., Rivers R., Shoukas A., Berkowitz D.E. Inducible NO synthase dependent S-nitrosylation and activation of arginase1 contribute to age-related endothelial dysfunction. *Circ. Res.*, 2007, Vol. 101, pp. 692-702.
92. Savaraj N., You M., Wu C., Wangpaichitr M., Kuo M.T., Feun L.G. Arginine deprivation, autophagy, apoptosis (AAA) for the treatment of melanoma. *Curr. Mol. Med.*, 2010, Vol. 10, pp. 405-412.
93. Schneemann M., Schoeden G. Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 81, no. 3, p. 579.
94. Schneemann M., Schoeden G. Species differences in macrophage NO production are important. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 2, p. 102.
95. Scotton C.J., Martinez F.O., Smelt M.J., Sironi M., Locati M., Mantovani A., Sozzani S. Transcriptional profiling reveals complex regulation of the monocyte IL-1 β system by IL-13. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, pp. 834-845.
96. Takahashi Y., Mai M., Nishioka K. alpha-difluoromethylornithine induces apoptosis as well as anti-angiogenesis in the inhibition of tumor growth and metastasis in a human gastric cancer model. *Int. J. Cancer*, 2000, Vol. 85, no. 2, pp. 243-247.
97. Takaku H., Takase M., Abe S., Hayashi H., Miyazaki K. In vivo antitumour activity of arginine deiminase purified from Mycoplasma arginine. *Int. J. Cancer*, 1992, Vol. 51, pp. 244-249.
98. Tasaki T., Kwon Y.T. The mammalian N-end rule pathway: new insights into its components and physiological roles. *Trends Biochem. Sci.*, 2007, Vol. 32, no. 11, pp. 520-528.
99. Tezuka H., Abe Y., Iwata M., Takeuchi H., Ishikawa H., Matsushita M., Shiohara T., Akira S., Ohteki T. Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cell. *Nature*, 2007, Vol. 448, pp. 929-933.
100. Thomas A.C., Mattila J.T. "Of mice and men": arginine metabolism in macrophages. *Front Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 479.
101. Thomas J.B., Holtsberg F.W., Ensor C.M., Bomalaski J.S., Clark M.A. Enzymic degradation of plasma arginine using arginine deiminase inhibits nitric oxide production and protects mice from the lethal effects of tumour necrosis factor alpha and endotoxin. *Biochem. J.*, 2002, Vol. 363, pp. 581-587.
102. Tumurkhuu G., Koide N., Dagvadorj J., Noman A.S.M., Khuda I.I.-E., Naiki Y., Komatsu T., Yoshida T., Yokochi T. B1 cells produce nitric oxide in response to a series of toll-like receptor ligands. *Cell. Immunol.*, 2010, Vol. 261, pp. 122-127.
103. Villalobo A. Nitric oxide and cell proliferation. *FEBS J.*, 2006, Vol. 273, no. 11, pp. 2329-2344.
104. Wakabayashi Y., Yamada E., Yoshida T., Takahashi H. Arginine becomes an essential amino acid after massive resection of rat small intestine. *J. Biol. Chem.*, 1994, Vol. 269, no. 51, pp. 32667-32671.
105. Wek R.C., Ramirez M., Jackson B.M., Hinnebusch A.G. Identification of positive-acting domains in GCN2 protein kinase required for translational activation of GCN4 expressio. *Mol. Cell. Biol.*, 1990, Vol. 10, no. 6, pp. 2820-2831.
106. Wek S.A., Zhu S., Wek R.C. The histidyl-tRNA synthetase-related sequence in the eIF-2 alpha protein kinase GCN2 interacts with tRNA and is required for activation in response to starvation for different amino acids. *Mol. Cell. Biol.*, 1995, Vol. 8, pp. 4497-5506.
107. Whiteside T.L., Rabinowich H. The role of Fas/FasL in immunosuppression induced by human tumors. *Cancer Immunol Immunother.*, 1998, Vol. 46, pp. 175-184.
108. Windmueller H.G., Spaeth A.E. Source and fate of circulating citrulline. *Am. J. Physiol.*, 1981, Vol. 241, pp. 473-480.
109. Winterhoff N., Goethe R., Gruening P., Rohde M., Kalisz H., Smith H.E., Valentin-Weigand P. Identification and characterization of two temperature-induced surface-associated proteins of Streptococcus suis with high homologies to members of the Arginine Deiminase system of Streptococcus pyogenes. *J. Bacteriol.*, 2002, Vol. 184, no. 24, pp. 6768-6776.
110. Wirawan E., Vanden Berghe T., Lippens S., Agostinis P., Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res.*, 2012, Vol. 1, no. 43-61.
111. Witte M.B., Barbul A. Arginine physiology and its implication for wound healing. *Wound Repair Regen.*, 2003, Vol. 11, pp. 419-423.
112. Wu G., Brosnan N.T. Macrophages can convert citrulline into arginine. *Biochem. J.*, 1992, Vol. 281, pp. 45-48.
113. Wynn T.A., Chawla A. and Pollard J.W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature*, 2013. Vol. 496, pp. 445-456.
114. Xia Y., Roman L.J., Masters B.S., Zweier J.L. Inducible nitric-oxide synthase generates superoxide from the reductase domain. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, pp. 22635-22639.
115. Yang J., Zhang R., Lu G., Shen Y., Peng L., Zhu C., Cui M., Wang W., Arnaboldi P., Tang M., Gupta M., Qi C. F., Jayaraman P., Zhu H., Jiang B., Chen S.-h., He J.C., Ting A.T., Zhou M.-MKuchroo V.K., Morse H.C., III,

Ozato K., Sikora A.G., Xiong H. T cell-derived inducible nitric oxide synthase switches off Th17 cell differentiation. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, pp. 1447-1462.

116. Yoshida J., Takamura S., Suzuki S. Cell growth inhibitory action of SAGP, an antitumor glycoprotein from *Streptococcus pyogenes* (Su strain). *Jpn. J. Pharmacol.*, 1987, Vol. 5, no. 2, pp. 143-147.

117. Yoshida J., Takamura S., Nishio M. Characterization of a streptococcal antitumor glycoprotein (SAGP). *Life Sci.*, 1998, Vol. 2, no. 12, pp. 1043-1053.

118. Zea A.H., Rodriguez P.C., Culotta K.S., Hernandez C.P., DeSalvo J., Ochoa J.B., Park H.J., Zabaleta J., Ochoa A.C. L-Arginine modulates CD3zeta expression and T cell function in activated human T lymphocytes. *Cell Immunol.*, 2004, Vol. 232, pp. 21-31.

119. Zhang R., Wang L., Zhang L., Chen J., Zhu Z., Zhang Z., Chopp M. Nitric oxide enhances angiogenesis via the synthesis of vascular endothelial growth factor and cGMP after stroke in the rat. *Circ. Res.*, 2003, Vol. 92, pp. 308-313.

120. Zharikov S., Krotova K., Hu H., Baylis C., Johnson R.J., Block E.R., Patel J. Uric acid decreases NO production and increases arginase activity in cultured pulmonary artery endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 2008, Vol. 295, pp. 1183-1190.

121. Zhu M.Y., Iyo A., Piletz J.E., Regunathan S. Expression of human arginine decarboxylase, the biosynthetic enzyme for agmatine. *Biochim. Biophys. Acta*, 2004, Vol. 1670, no. 2, pp. 156-164.

122. Zhuo W., Song X., Zhou H., Luo Y. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.*, 2011, Vol. 5, pp. 1376-1381.

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, отделение иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Соколов А.В. — к.б.н., заведующий лабораторией, отделение молекулярной генетики, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, отделение молекулярной микробиологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Фрейдлин И.С. — д.м.н., член-корр. РАН, главный научный сотрудник, отделение иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, North-Western Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov A.V., PhD (Biology), Head of Laboratory, Department of Molecular Genetics, Research Institute of Experimental Medicine, North-Western Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Researcher, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, North-Western Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Department of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, North-Western Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 16.06.2015
Принята к печати 14.07.2015

Received 16.06.2015
Accepted 14.07.2015

ОЦЕНКА ИММУНОТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ПРОЛОНГИРОВАННОГО ДЕЙСТВИЯ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА НА МАКАКАХ РЕЗУС

Джелия А.Б., Устюгов Я.Ю., Кортава М.А.

Закрытое акционерное общество «БИОКАД», п. Любучаны, Московская область, Россия

Резюме. В статье представлены результаты исследования иммунотоксичности нового лекарственного препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на основе рекомбинантного человеческого интерферона бета-1а. Препарат представляет собой конъюгат интерферона бета-1а и полиэтиленгликоля (ПЭГ). Проведенная модификация позволяет улучшить фармакокинетические показатели, а также снизить иммуногенность и улучшить переносимость, что значительно увеличивает безопасность исследуемого препарата. Исследование проведено на нечеловекообразных приматах — макаках резус (*Macaca mulatta*). Данный вид животных является чувствительным к действию интерферона бета-1а человека, что нами было показано ранее, в исследованиях специфической активности. В рамках экспериментов *in vivo* оценивали динамику субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови, количество активированных лимфоцитов, по наличию маркера ранней активации, уровень и соотношение сывороточных антител (IgM, IgG, IgA и IgE). В культуре мононуклеаров исследовали влияние интерферона бета-1а на уровень экспрессии CD69. Показано, что исследуемый препарат вызывает изменения соотношения субпопуляций лимфоцитов (снижение относительного числа NK-клеток и повышение относительного числа Т-лимфоцитов) в периферической крови приматов. Выявленные изменения носили обратимый характер и не зависели от использованной дозы препарата. Не было показано достоверного влияния препарата на уровень экспрессии CD69. В отсутствие дополнительной антигенной стимуляции не было показано влияния на уровень и соотношение сывороточных антител, оцениваемых классов, а также на фагоцитарную активность полиморфоядерных лейкоцитов. Полученные в ходе исследования результаты свидетельствуют об отсутствии патологического влияния исследуемого препарата на иммунную систему нечеловекообразных приматов.

Ключевые слова: рассеянный склероз, интерфероны, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, натуральные киллерные клетки, антиген CD69, иммуноглобулины

Адрес для переписки:

Джелия Апсуана Борисовна
ЗАО «БИОКАД»
142380, Россия, Московская область, Чеховский район,
п. Любучаны, ул. Научная, 1.
Тел.: 8 (812) 380-49-33 (доб. 442).
Факс: 8 (812) 380-49-34.
E-mail: dzheliya@biocad.ru

Address for correspondence:

Dzheliya Apsuana B.
CJSC "BIOCAD"
142380, Russian Federation, Moscow Region, Chekhov district,
Lubuchany, Nauchnaya str., 1.
Phone: 7 (812) 380-49-33 (ext. 442).
Fax: 7 (812) 380-49-34.
E-mail: dzheliya@biocad.ru

Образец цитирования:

А.Б. Джелия, Я.Ю. Устюгов, М.А. Кортава, «Оценка иммунотоксичности лекарственного препарата пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на макаках резус» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 319–326. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-319-326

© Джелия А.Б. и соавт., 2015

For citation:

A.B. Dzheliya, Ya. Yu. Ustyugov, M.A. Kortava, "Evaluation of immunotoxicity of the therapeutic drug prolonged action for multiple sclerosis on rhesus monkeys", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 319–326. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-319-326

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-319-326>

EVALUATION OF IMMUNOTOXICITY OF THE THERAPEUTIC DRUG PROLONGED ACTION FOR MULTIPLE SCLEROSIS ON RHESUS MONKEYS

Dzyeliya A.B., Ustyugov Ya.Yu., Kortava M.A.

CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Abstract. This article presents the results of immunotoxicity study of a novel slow-release drug for multiple sclerosis treatment based on recombinant human interferon beta-1a. The test article is polyethylene glycol (PEG)-conjugated interferon beta-1a. Performed modification allows to improve pharmacokinetic parameters, decrease immunogenicity and elevate tolerance that significantly increases safety of the test article. The study is performed in nonhuman primates – rhesus monkeys (*Macaca mulatta*). The species, used in this study, is susceptible to human interferon beta-1a that has previously been shown in specific activity studies. Dynamics of peripheral blood lymphocyte subsets composition, activated lymphocyte count (based on the presence of early activation marker), serum antibodies (IgM, IgG, IgA and IgE) level and ratio were assessed within *in vivo* experiments. The effect of interferon beta-1a on CD69 expression was examined in mononuclear cells culture. It was shown that the test article causes changes in lymphocyte subsets ratio (decrease of NK-cells relative count with T-lymphocytes relative count elevation) in primates' peripheral blood. Revealed changes were reversible and dose-independent. It was not shown that the test article have reliable effect on CD69 expression rate. There was no evidence of test article effect on level and ratio of serum antibodies and polymorphonucleocytes phagocytic rate in the absence of additional antigenic exposure. The results obtained during the experiment indicate the absence of pathological effect of the test article on the nonhuman primates' immune system.

Keywords: multiple sclerosis, interferons, T lymphocytes, B lymphocytes, natural killer cells, CD69 antigen, immunoglobulins

Введение

Рассеянный склероз (РС) представляет собой хроническое прогрессирующее заболевание человека, характеризующееся развитием очагов демиелинизации в центральной и периферической нервной системе [2]. Иммунологические изменения при РС проявляются отклонениями клеточного и гуморального иммунитета. В период обострения заболевания обнаруживается незначительное снижение зрелых Т-лимфоцитов (CD3⁺), преимущественно за счет субпопуляций Treg-клеток, а также повышение пролиферативной и функциональной активности клеток в ответ на митогены.

Иммуномодуляторные препараты IFN β , такие как Бетаферон, Авонекс, Ребиф, обладают большим терапевтическим потенциалом. Однако применение данных препаратов сопряжено с развитием ряда побочных реакций.

Одним из путей повышения эффективности и безопасности интерферона бета-1a является «пегилирование» молекулы лекарственного препарата. Подобная химическая модификация адресно направлена на улучшение их переноси-

мости, снижение иммуногенности, повышение периода их полужизни и, как следствие всего перечисленного, на значительное повышение качества жизни в процессе проведения лечения [4, 7, 10, 16, 19].

В данном исследовании проведена сравнительная оценка влияния исследуемого препарата пегилированного интерферона бета-1a (ПЕГ IFN β -1a) и препарата-стандарта – интерферона бета-1a (IFN β -1a) (фирма-производитель ЗАО «БИОКАД») на иммунную систему нечеловекообразных приматов.

Материалы и методы

Работа выполнена на нечеловекообразных приматах – макаках резус (*Macaca mulatta*) на базе Научно-исследовательского института экспериментальной патологии и терапии Академии наук Абхазии, г. Сухум. Исследование проведено на 28 обезьянах *Macaca mulatta* в возрасте от 3 до 7 лет, массой 4,0–7,0 кг.

ПЕГ IFN β -1a вводили один раз в две недели в течение 12 недель с последующим 4-недельным восстановительным периодом. Немодифициро-

ванный IFN β -1a вводили подкожно 3 раза в неделю.

Определение субпопуляционного состава лимфоцитов

Оценку проводили на проточном цитофлуориметре EpiX XL (Beckman Coulter) с использованием реагентов меченых антител производства BD (США).

Определение маркера активации CD69 в культурах мононуклеарных клеток

Для определения числа CD69⁺ клеток использовали 24-часовую культуру мононуклеаров цельной периферической крови. Для оценки стимулирующего действия на экспрессию CD69 исследуемого препарата и препарата-стандарта использовали нестимулированные и стимулированные пробы (вносили IFN β -1a).

Определение уровня иммуноглобулинов в сыворотке крови

Определение уровня антител разных классов в сыворотке крови проводили до введения препарата, на 12 и 16 неделе эксперимента. Для определения количества антител использовали иммуноферментную тест-систему Life Diagnostics Inc (США).

Постановка реакции бласттрансформации

Оценку пролиферативного ответа проводили в 72-часовых культурах с использованием 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил тетразолия бромида (МТТ) [24].

Статистический анализ

Статистическая обработка данных производилась с помощью пакета «Statistica for Windows 6.0», применялся непараметрический тест Манна–Уитни [1].

Результаты

В работах ряда авторов рассматривается возможное участие натуральных киллерных клеток (НК-клеток) в развитии рассеянного склероза [13, 15, 17, 22]. В настоящее время имеется достаточно клинических данных, позволяющих говорить о влиянии препаратов интерферонов бета на данную субпопуляцию клеток [17, 20].

Наши исследования показали, что изменение относительного числа НК-клеток у приматов всех экспериментальных групп происходило идентично. На 6-ой и 12-ой неделе, наблюдали тенденцию к снижению относительного числа НК-клеток, в сравнении с фоновыми показателями. На 16-й неделе эксперимента, напротив, было отмечено повышение числа НК-клеток, в сравнении с фоновыми показателями. Достоверное увеличение НК-клеток наблюдали во всех экспериментальных группах, за исключением приматов, получавших подкожно ПЭГ IFN β -1a

в дозе $0,3 \times 10^6$ МЕ/кг, где была отмечена только тенденция к увеличению оцениваемого показателя. Полученные результаты согласуются с клиническими данными, полученными при применении препаратов интерферона в лечении рассеянного склероза [12, 20].

Оценка относительного числа В-лимфоцитов в периферической крови экспериментальных приматов не выявила влияния препаратов ПЭГ IFN β -1a и IFN β -1a на рассматриваемый параметр.

Оценка относительного и абсолютного числа Т-лимфоцитов (CD3⁺ клетки) в периферической крови макака резус показала, что при многократном введении исследуемого препарата наблюдается тенденция к повышению относительного числа Т-клеток в крови приматов в течение периода введения препарата. На момент окончания восстановительного периода уровень Т-лимфоцитов возвращался к фоновым значениям. При многократном внутримышечном введении модифицированного препарата в дозе $0,3 \times 10^6$ МЕ/кг имела место тенденция к снижению Т-клеток.

На всех сроках эксперимента у всех животных относительное число Т-клеток оставалось в пределах видовой физиологической нормы [3].

Анализ полученных экспериментальных данных показал, что снижение относительного числа НК-клеток в периферической крови приматов в течение периода введения модифицированного и немодифицированного препаратов интерферона бета-1a сопровождается повышением числа Т-клеток, и, напротив, на момент окончания восстановительного периода, снижение числа Т-лимфоцитов у животных экспериментальных групп скомпенсировано повышением относительного числа НК-клеток. Выявленный характер изменений и его выраженность являлись общими для обеих форм препарата, не зависели от их способа введения и использованной дозы (рис. 1).

При анализе динамики отдельных субпопуляций Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁻ Т-хелперы; CD3⁺CD4⁻CD8⁺ цитотоксические Т-клетки) было показано, что для всех экспериментальных животных характерно наличие тенденции к увеличению числа Т-хелперных клеток в течение периода введения препаратов. На момент окончания восстановительного периода (16-я неделя) отмечалось снижение относительного числа CD3⁺CD4⁺CD8⁻ клеток, в сравнении с периодом окончания введения (12-я неделя). Выявленное увеличение относительного числа хелперных клеток может быть связано со стимулирующим

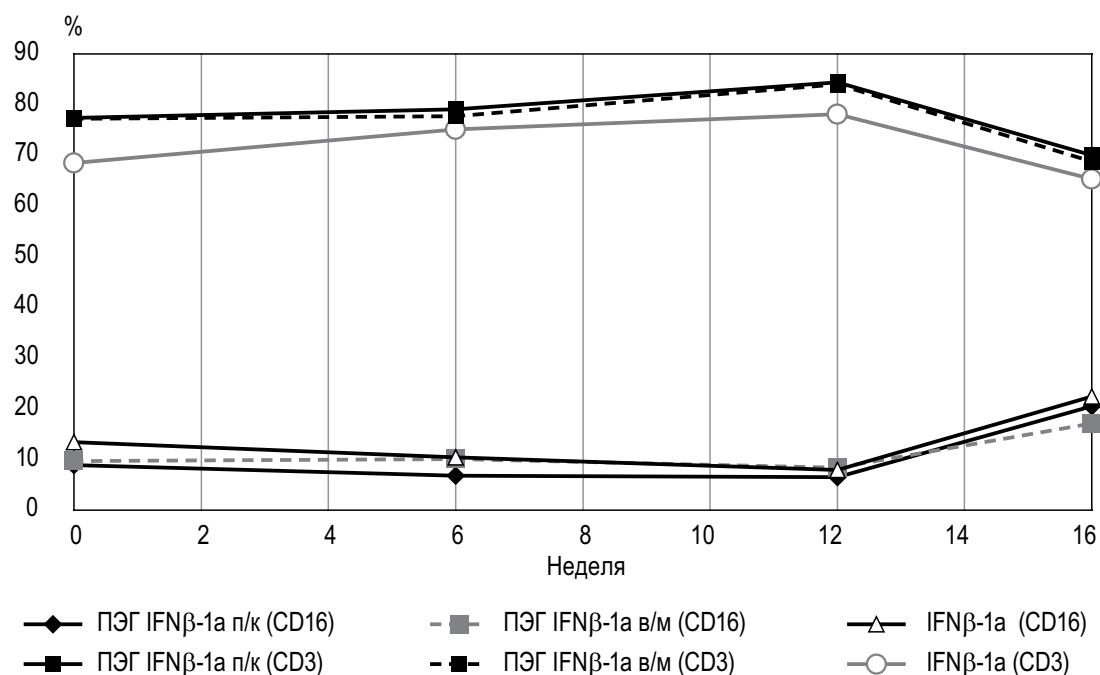


Рисунок 1. Динамика относительного числа НК-клеток и Т-лимфоцитов в периферической крови приматов при введении препаратов модифицированного и немодифицированного интерферона бета в дозе $3,0 \times 10^6$ МЕ/кг
Примечание. п/к – подкожный способ введения; в/м – внутримышечный способ введения.

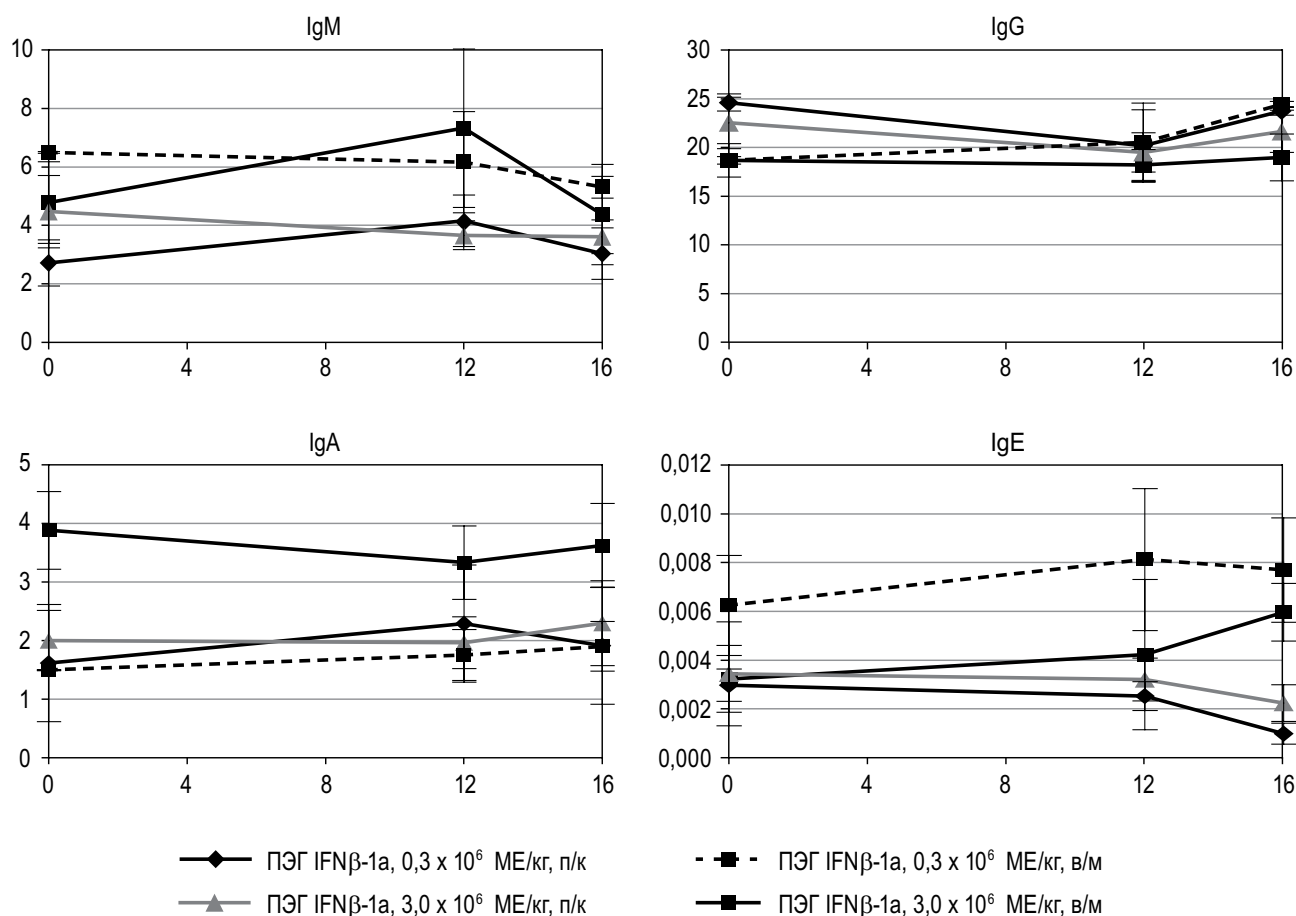


Рисунок 2. Уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови приматов при многократном введении ПЭГ IFNβ-1a

влиянием интерферона бета на регуляторные Т-клетки.

Снижение количества CD3⁺CD4⁺CD8⁻ клеток на момент окончания восстановительного периода являлось следствием отмены препарата и последующего снижения абсолютного количества Т-лимфоцитов (CD3⁺ клетки). Достоверных изменений в количестве цитотоксических Т-клеток выявлено не было.

Данные, приводимые рядом авторов, о влиянии препаратов интерферонов I типа на антителогенез в ответ на введение эритроцитов барана мышам свидетельствуют о возможном влиянии исследуемого препарата на гуморальный иммунный ответ при его клиническом применении [5, 6, 9]. Исследования последних лет показали, что влияние IFN β -1a на функциональное состояние В-клеток и уровень иммуноглобулинов в сыворотке крови может быть опосредовано уровнем фактора активирующего В-клетки (BAFF). Так, было показано, что при использовании препаратов интерферона бета в клинической практике для лечения рассеянного склероза наблюдается повышение уровня BAFF, чего не происходит у пациентов с рассеянным склерозом, не получающих интерферон [11].

Для оценки влияния препарата ПЭГ IFN β -1a на гуморальное звено иммунитета, оценивали динамику уровня антител 4-х классов: IgM; IgG; IgA и IgE (рис. 2).

Анализ экспериментальных данных показал, что уровень и соотношение иммуноглобулинов всех 4-х классов в течение срока исследования не имели значимых отличий и находились в пределах видовой физиологической нормы.

Одним из самых ранних поверхностных маркеров активации лимфоцитов является CD69. Данный белок экспрессируется на поверхности активированных Т- и В-лимфоцитов, натуральных киллеров, нейтрофилов, эозинофилов, эпидермальных клеток Лангерганса и тромбоцитов [18, 23].

В работах ряда авторов показано, что применение препаратов интерферонов первого типа (альфа/бета) сопряжено с изменением уровня экспрессии поверхностных маркеров активации [8, 21]. Так, выраженность экспрессии CD69 при применении IFN β в исследованиях *in vitro* и *in vivo* носит дозозависимый характер и может являться одним из показателей эффективности применения исследуемого препарата при рассеянном склерозе [14].

Уровень клеток, положительных по маркеру CD69, в культурах мононуклеаров крови экспериментальных животных, без внесения препарата, на 6-й неделе эксперимента имел тенденцию к снижению с последующим повышением на 12-й неделе и возвращением к фоновому уровню на момент окончания восстановительного периода (табл. 1). При внесении IFN β в культуры

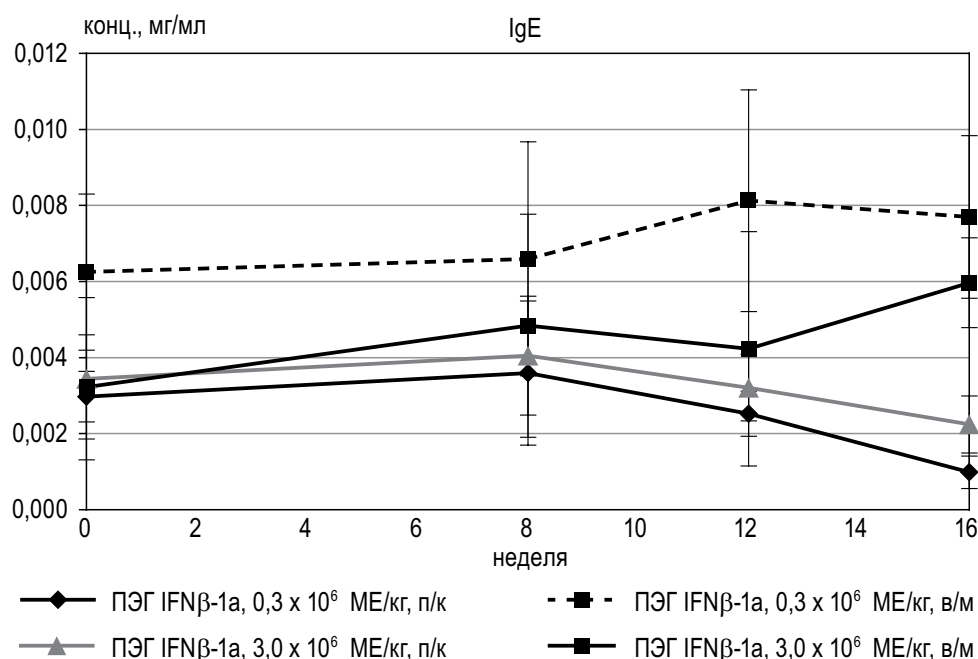


Рисунок 3. Уровень реактивных антител в сыворотке экспериментальных приматов при многократном введении ПЭГ IFN β -1a

клеток крови животных, получавших модифицированный препарат, наблюдали увеличение относительного числа CD69⁺ клеток на 12 неделе эксперимента в сравнении с фоновыми показателями. На момент окончания восстановительного периода число клеток, положительных по оцениваемому маркеру, возвращалось к фоновым значениям. Изменения не носили достоверного характера и не зависели от использованной дозы и способа введения.

При анализе содержания CD69⁺ клеток в культурах мононуклеаров крови приматов, получавших немодифицированный интерферон бета-1а, на 6-й и 12-й неделе наблюдали снижение количества CD69⁺ клеток, возвращающееся к фоновым значениям на момент окончания восстановительного периода. Увеличение относительного числа CD69⁺ клеток в культуре мононуклеарных клеток является проявлением иммуностропного действия интерферона бета [14]. Полученные в ходе данного эксперимента результаты показывают, что исследуемый препарат вне зависимости от дозы и способа введения, как и препарат-стандарт, оказывает влияние на уровень экспрессии маркера активации CD69.

Оценка алергизирующей активности является обязательной частью общей программы оценки безопасности фармакологических веществ. В данном исследовании проводили оценку способности индуцировать аллергические реакции двух типов (I и IV тип по классификации Джелла и Кумбса). Данные типы гиперчувствительности являются наиболее важными при развитии патологических процессов аллергической природы при применении белковых препаратов, полученных биотехнологическими методами.

Для оценки возможной индукции гиперчувствительности замедленного типа исследуемым препаратом использовали реакцию бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ).

В течение всего срока эксперимента не наблюдалось значимых изменений в уровне пролиферативной активности лимфоцитов периферической крови, что справедливо для всех использованных для стимуляции доз IFN β -1а. Отсутствие достоверных изменений значений индекса пролиферации у экспериментальных животных свидетельствует о том, что препарат не обладает способностью к индукции гиперчувствительности замедленного типа (табл. 2).

Исследование способности к индукции аллергии I типа по Джеллу и Кумбсу проводили по уровню реагиновых антител (IgE). Динамика уровня IgE в сыворотке животных экспериментальных групп представлена на рисунке 3.

В течение всего срока эксперимента не было выявлено значимых отличий или закономерной тенденции к изменению уровня IgE во всех экспериментальных группах.

Обсуждение

На протяжении всего срока эксперимента проводили оценку субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови приматов, активированных лимфоцитов, уровня антител (IgM, IgG, IgA и IgE), уровня экспрессии CD69 в 24-часовой культуре мононуклеаров, алергизирующей активности (I и IV тип по Джеллу и Кумбсу), фагоцитарной активности полиморфноядерных лейкоцитов. Оценка функционального состояния иммунной системы приматов проводили на фоне введения препарата без дополнительной антигенной стимуляции.

Изменения, выявленные в ходе эксперимента, касались соотношения субпопуляций лимфоцитов (NK-клеток и Т-лимфоцитов). Выявленные изменения носили обратимый характер и в наибольшей степени касались групп животных, получавших препараты в максимальной использованной дозе.

Не было выявлено значимого влияния исследуемого препарата и препарата-стандарта на уровень экспрессии маркеров активации.

В отсутствие дополнительной антигенной стимуляции при многократном введении пегилированного интерферона бета-1а не наблюдали влияние на уровень оцениваемых классов антител, что также справедливо для препарата-стандарта и не зависит от использованной дозы и половой принадлежности животных.

Оценка уровня CD69⁺ клеток в 24-часовой культуре мононуклеаров показала, что внесение IFN β -1а в культуры клеток крови экспериментальных животных сопровождается тенденцией к увеличению значения оцениваемого параметра.

Фагоцитарная активность полиморфноядерных лейкоцитов не изменялась в течение всего срока эксперимента при многократном введении исследуемого препарата и препарата-стандарта.

ПЕГ IFN β -1а и IFN β -1а не обладают алергизирующим действием.

Лекарственный препарат пролонгированного действия для лечения рассеянного склероза на основе рекомбинантного человеческого интерферона бета-1а производства ЗАО «БИО-КАД», при выбранной схеме введения, не оказывает патологических изменений функциональной активности компонентов иммунной системы как резус.

Список литературы / References

1. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. Ленинград: Медгиз, 1963. С. 81-117. [Belenkiy M.L. Elements of quantitative assessment of pharmacological effect]. Leningrad: Medgis, 1963, pp. 81-117.
2. Бородулин В.И., Ланцман М.Н. Справочник: Болезни. Синдромы. Симптомы. М.: Оникс, 2009. С. 896. Borodulin V.I., Lanzman M.N. Reference: Diseases. Syndromes. Symptoms]. Moscow: Опух, 2009, p. 896.
3. Куксова М.И. Кроветворная система обезьян в норме и патологии. М.: Медицина, 1972. С. 128. [Kuksova M.I. Hematopoietic system of monkeys in health and disease]. Moscow: Medicine, 1972, pp. 128.
4. Никитин И.Г., Сторожаков Т.Н. Пегилированные лекарственные препараты: современное состояние проблемы и перспективы // Информационный бюллетень «Вирусные гепатиты: достижения и перспективы», 2001. № 3 (13). [Nikitin I.G., Storozhakov T.N. PEGylated drugs: state of the art and perspectives. Information Bulletin «Viral hepatitis: Achievements and Prospects», 2001, no. 3 (13). (In Russ.)]
5. Bon A.L., Schiavoni G., Agostino G., Gresser I., Belardeli F., Tough D.F. Type I Interferons Potently Enhance Humoral Immunity and Can Promote Isotype Switching by Stimulating Dendritic Cells *In Vivo*. *Immunity*, 2001, Vol. 14, pp. 461-470.
6. Brodeur, B.R., Merigan, T.C. Suppressive effect of interferon on the humoral immune response to sheep red blood cells in mice. *J. Immunol.*, 1974, no. 113, pp. 1319-1325.
7. Bruce A. Clinical considerations in pegylated protein therapy. *From Research to Practice*, 2001, no. 3 (1), pp. 3-9.
8. Cebrian M., Redondo J.M., Lopez-Rivas A., Rodriguez-Tarduchy G., De Landazuri M.O., Sánchez-Madrid F. Expression and function of AIM, an activation inducer molecule of human lymphocytes, is dependent on the activation of protein kinase C. *Eur. J. Immunol.*, 1989, May, no. 19 (5), pp. 809-815.
9. De Maeyer E., De Maeyer-Guignard J. Host genotype influences immunomodulation by interferon. *Nature*, 1980, no. 284, pp. 173-175.
10. Delgado C., Francis G.E., Fisher D. The uses and properties of PEG – linked proteins. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, 1992, no. 9 (3, 4), pp. 249-304.
11. Dhib-Jalbut S., Marks S. Interferon- β mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology*, 2010, pp. 74-17.
12. Hartrich L., Weinstock-Guttmanb, Halle D., Badgett D., Baierd M., Patrickb K., Feichterb J., Hongc J., Ramanathan M. Dynamics of immune cell trafficking in interferon-h treated multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 2003, no. 139, pp. 84-92.
13. Horwitz, D.A., Gray, J.D., Ohtsuda, K., Hirokawa, M., Takahashi, T. The immunoregulatory effects of NK cells: the role of TGF β and implications for autoimmunity. *Immunol. Today*, 1997, no. 18 (11), pp. 538-542.
14. Huang Y.M., Hussien Y., Jin Y-P, Söderstrom M., Link H. Multiple sclerosis: deficient *in vitro* responses of blood mononuclear cells to IFN- β . *Acta Neurol Scand*, 2001, no. 104, pp. 249-256.
15. Kos F.J., Engleman E.G. Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol. Today*, 1996, no. 17(4), pp. 174-176.
16. Muggia F. The Benefits of pegylation in cancer and antiviral therapy *From Research to Practise*, 2001, no. 3 (1), pp. 1-3.
17. Munschauer, F.E., Hartrich, L.A., Stewart, C.C., Jacobs, L. Circulating natural killer but not cytotoxic T lymphocytes are reduced in patients with active relapsing multiple sclerosis and little clinical disability as compared to controls. *J. Neuroimmunol.*, 1995, no. 62 (2), pp. 81-177.
18. Natarajan K., Sawicki M. V., Margulies D., Mariuzza R. Crystal Structure of Human CD69: A C-Type Lectin-Like Activation Marker of Hematopoietic Cells. *Biochemistry*, 2000, no. 39, pp. 14779-14786.
19. Northfeld D.W., Dezube B.J., Thommes J.A. Pegylated – liposomal doxorubicin versus doxorubicin, bleomycin and vincristine in the treatment of AIDS – related Kaposhi's sarcoma: results of a randomized, phase 1/1 clinical trial. *J. Clin. Oncol.*, 1998, no. 16, pp. 2445-2451.
20. Perini P., Wadhwa M., Buttarello M., Meager A., Facchinetti A., Thorpe R., Biasi G., Galloa P. Effect of IFN β and anti-IFN β antibodies on NK cells in multiple sclerosis patients. *Journal of Neuroimmunology*, 2000, no. 105 (1), pp. 5-91.

21. Rani S., Shrock J., Appachi S., Rudick A., Williams B., Ransohoff R. Novel interferon-beta-induced gene expression in peripheral blood cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 2007, Vol. 82, pp. 1353-1360.
22. Takahashi K., Aranami T., Endoh M., Miyake T., Yamamur T. The regulatory role of natural killer cells in multiple sclerosis. *Brain*, 2004, Vol. 127, no. 9, pp. 1917-1927.
23. Testi R., D'Ambrosio D., De Maria R., Santoni A. The CD69 receptor: a multipurpose cell-surface trigger for hematopoietic cells. *Immunol. Today*, 1994, no. 15, pp. 479-483.
24. Vega A., Pugsley M.K. An overview of colometric assay methods used to assess survival or proliferation of mammalian cells. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 2011, no. 54, pp. 10-14.

Авторы:

Джелия А.Б. — младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной биологии, Закрытое акционерное общество «БИОКАД», п. Любучаны, Московская область, Россия

Устюгов Я.Ю. — к.б.н., заведующий лабораторией экспериментальной биологии, Закрытое акционерное общество «БИОКАД», п. Любучаны, Московская область, Россия

Кортава М.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной биологии, ЗАО «БИОКАД», Московская обл., Россия

Authors:

Dzheliya A.B., Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Biology, CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Ustyugov Ya. Yu., PhD (Biology), Head, Laboratory of Experimental Biology, CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Kortava M.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Experimental Biology, CJSC "BIOCAD", Lubuchany, Moscow Region, Russian Federation

Поступила 05.05.2015
Отправлена на доработку 13.05.2015
Принята к печати 17.05.2015

Received 05.05.2015
Revision received 13.05.2015
Accepted 17.05.2015

КОМОРБИДНОСТЬ, МЕТИЛИРОВАНИЕ ДНК И АУТОИММУНИТЕТ ПРИ ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННОМ ОСТЕОАРТРИТЕ: ПОИСКОВОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Ширинский И.В.¹, Сазонова О.В.^{2,3}, Калиновская Н.Ю.¹,
Ширинский В.С.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² Городской диабетологический центр, г. Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный медицинский университет, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Остеоартрит (ОА) является одной из актуальных проблем клинической медицины не только вследствие большой распространенности, но и повышенной частоты коморбидной патологии. Ранее нами был описан клинический фенотип ОА в сочетании с СД 2 типа (ОАСД), являющийся субтипом ОА и характеризующийся большей тяжестью ОА, сниженным уровнем качества жизни. В настоящее время в литературе отсутствуют данные о биомаркерах ОАСД. Исходя из современных знаний о механизмах развития СД 2 типа и ОА, предполагается, что ключевым молекулярным звеном патогенеза этих заболеваний могут быть нарушения процессов метилирования ДНК. Ряд факторов (хроническое системное воспаление, повышение содержания конечных продуктов гликирования) может приводить к усилению деградации хряща при ОА, ассоциированном с СД 2 типа. Как ОА, так и СД 2 характеризуются высоким бременем коморбидной патологии, что позволяет предположить аддитивный эффект сочетания этих заболеваний на индексы коморбидности. Таким образом, в поисковом исследовании у больных ОАСД изучалось глобальное метилирование ДНК в мононуклеарах периферической крови (МНК ПК), биомаркеры деструкции в хрящевой ткани и показатели коморбидности. Уровень глобального метилирования ДНК в МНК ПК оценивался как содержание 5-метилцитозина с помощью проточной цитометрии. Определение содержания агрегана и антител к коллагену II типа в сыворотке ПК проводили методом ИФА. Показатели коморбидности оценивались с помощью шкалы CIRS-G (Cumulative Illness Rating Scale). Обследовано 78 больных генерализованным ОА. Опытную группу составили 52 больных, у которых клиническим проявлением ОА не менее года предшествовал СД 2 типа. В контрольную группу были включены 26 больных ОА без СД. Установлено, что, помимо тяжелых клинических проявлений суставного синдрома и наличия системного воспаления, у больных ОАСД определяется высокий уровень тяжести коморбидности, обусловленный не только СД, но и другими сопутствующими заболеваниями. Различий по другим показателям коморбидности между сравниваемыми группами не выявлено. У пациентов с ОАСД также регистрируется увеличе-

Адрес для переписки:

Ширинский Иван Валерьевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 228-25-47.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: ishirinsky@mail.ru

Address for correspondence:

Shirinsky Ivan V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 228-25-47.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: ishirinsky@mail.ru

Образец цитирования:

И.В. Ширинский, О.В. Сазонова, Н.Ю. Калиновская,
В.С. Ширинский, «Коморбидность, метилирование
ДНК и аутоиммунитет при диабет-ассоциированном
остеоартрите: поисковое исследование» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 327-334.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-327-334

© Ширинский И.В. и соавт., 2015

For citation:

I.V. Shirinsky, O.V. Sazonova, N.Yu. Kalinovskaya, V.S. Shirinsky,
“Comorbidity, DNA methylation and autoimmunity in diabetes-
associated osteoarthritis: an exploratory study”, Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17,
no. 4, pp. 327-334. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-327-334

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-327-334>

ние содержания в сыворотке ПК агрекана и антител к другому матричному компоненту деструкции — коллагену II. Показано, что МНК ПК больных ОАСД и больных ОА без сопутствующего СД характеризуются более высоким, чем у здоровых людей, уровнем метилирования ДНК. Заключается, что дальнейшие исследования эпигенетической регуляции воспаления, метаболизма хрящевой ткани у больных ОА позволят идентифицировать новые терапевтические мишени и разработать более эффективные методы терапии не только основного, но и сопутствующих заболеваний.

Ключевые слова: остеоартрит, сахарный диабет, метилирование ДНК, иммунная система

COMORBIDITY, DNA METHYLATION AND AUTOIMMUNITY IN DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS: AN EXPLORATORY STUDY

Shirinsky I.V.^a, Sazonova O.V.^{b, c}, Kalinovskaya N.Yu.^a, Shirinsky V.S.^a

^a Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

^b Novosibirsk City Diabetic Center, Novosibirsk, Russian Federation

^c Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Osteoarthritis (OA) is among challenging problems of clinical medicine, not only due to its high prevalence, but also because of higher burden of comorbidities. Previously we described a clinical phenotype of OA associated with type 2 diabetes mellitus (OADM), which is one of OA phenotypes characterized by increased severity and reduced quality of life. In current literature, there is a lack of data on OADM biomarkers. Based on the current knowledge on type 2 DM and OA pathogenesis, it may be suggested that disturbances of DNA methylation may present the key pathogenetic mechanism for the both diseases. A number of factors, for example, chronic systemic inflammation, or increased levels of advanced glycation end products, may lead to increased articular cartilage degradation in type 2 DM-associated OA. Both OA and type 2 DM are characterized by higher comorbidity burden, thus allowing to suggest that coexistence of these diseases leads to additive effects upon comorbidity indices. In this exploratory study, we evaluated levels of total DNA methylation in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), along with biomarkers of serum cartilage degradation and comorbidity features in patients with OA associated with diabetes (OADM). Global DNA methylation in PBMC was assessed as 5-methylcytosine levels using flow cytometry. Circulating aggrecan and anti-CII antibody concentrations were measured by means of ELISA. Comorbidity indices were assessed using Cumulative Illness Rating Scale (CIRS-G). A total of 78 patients with generalized OA were assessed. Fifty two patients had clinical manifestations of OA preceded by DM type II for 1 year (case group), and 26 OA patients were non-diabetic (control group). Patients with OADM had more pronounced joint impairment and higher severity of comorbidity. There were no differences in other measures of comorbidity between the compared groups. In conclusion, further studies on epigenetic control of inflammation and cartilage metabolism in patients with OA will enable to identify new therapeutic targets and to define new treatment strategies for the both basic disorder and comorbidity states.

Keywords: osteoarthritis, diabetes mellitus, DNA methylation, immune system

Введение

Остеоартрит (ОА) является одной из актуальных проблем клинической медицины не только вследствие большой распространенности, но и из-за высокой частоты коморбидной патологии: ожирения, сахарного диабета (СД), артериальной гипертензии (АГ), инсулинорезистентности и дислипидемии [1, 2, 6, 8]. Патогенез ОА связывают с взаимосвязанной комбинацией множества факторов (генетических, эпигенетических,

биомеханических, метаболических и др.), которые в итоге приводят к развитию персистирующего воспаления во всех структурах сустава, вовлечению в процесс клеток иммунной системы, жировой ткани, их медиаторов и формированию разнородных по фенотипу и этиопатогенезу клинических вариантов (субтипов) болезни [3, 13].

Ранее нами был описан фенотип ОА в сочетании с СД 2 (ОАСД), являющийся субтипом ОА и характеризующийся большей тяжестью ОА, сниженным уровнем качества жизни [32]. Кли-

нические проявления бремени болезни у больных ОАСД ассоциируются с лабораторными показателями вялотекущего системного воспаления: повышением уровня провоспалительных (IL-6, IL-18) и снижением содержания противовоспалительных цитокинов (IL-10, адипонектин) в сыворотке периферической крови [33].

Предполагается, что среди механизмов, лежащих в основе формирования воспалительных и дегенеративных изменений у больных ОА, присоединения коморбидной патологии, важная роль принадлежит эпигеномным изменениям регуляции экспрессии генов, обусловленных нарушением метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, функции микроРНК, выявленным в клетках различного гистогенеза: хондроцитах, синовиоцитах, адипоцитах, макрофагах, лимфоцитах и др. [11, 17, 18]. Так, показано, что хондроциты больных ОА характеризуются гипометилированием специфических CpG сайтов в промоторах генов ряда металлопротеиназ, супероксиддисмутазы [28, 29]. С другой стороны, метилирование ДНК не является ключевым компонентом в подавлении синтеза хондроцитами агрекана [27], а снижение экспрессии остеогенного протеина-1 (OP-1) в «старых» хондроцитах *in vitro* ассоциировано с гиперметилированием промотора гена OP-1 [14]. Показано, что при ожирении, СД — заболеваниях, часто сопутствующих ОА, уровень метилирования ДНК в В-лимфоцитах и NK-клетках значительно повышен [30]. В задачу исследования входило определение уровня глобального метилирования ДНК в мононуклеарах периферической крови (МНК ПК) больных с диабет-ассоциированным ОА (ДАОА), содержания сывороточных биомаркеров деструкции хряща и оценка показателей коморбидности.

Материалы и методы

Обследовано 78 больных генерализованным (поражение трех и более суставов) ОА: 52 больных опытной группы (82,6% женщины), у которых клиническим проявлениям ОА не менее года предшествовал сахарный диабет второго типа (СД) и 26 больных ОА (84,6% женщины) без СД. Тридцать два пациента с СД (61,5%) принимали антидиабетические препараты в таблетированной форме, 20 человек (38,5%) получали терапию инсулином или сочетанное лечение. Для уменьшения выраженности боли больные нерегулярно получали простые анальгетики (ацетаминофен), нестероидные противовоспалительные средства в разных дозировках.

Клинические и рентгенологические признаки гонартроза выявлены у 100% больных обеих групп, частота проявлений коксартроза и артроза

кисти в обеих группах пациентов не отличалась. Показатели коморбидности определялись согласно ранее предложенному методу Cumulative Illness Rating Scale (CIRS-G) [26]. CIRS-G заключается в оценке 14 систем организма по пятибалльной шкале тяжести (0 — отсутствие проблем, 1 — небольшие проблемы в настоящем или значительные проблемы в прошлом, 2 — умеренное нарушение функции/заболевание, требующие терапии «первой линии», 3 — тяжелые/постоянные нарушения/«неконтролируемые» хронические проблемы, 4 — чрезвычайно тяжелые/требующие немедленного лечения/терминальная недостаточность органов/тяжелое нарушение функции и определение индекса тяжести коморбидности (средний показатель всех пунктов CIRS-G, исключая психиатрические и поведенческие факторы) и индекса коморбидности (суммарный счет).

Оценка функции суставов и забор крови проводилась до приема пациентами лекарственных препаратов.

Группа условно здоровых людей состояла из 11 человек (3 мужчин и 8 женщин) в возрасте 19-20 лет без клинических проявлений острых и хронических заболеваний.

Определение содержания агрекана и анти-тел к коллагену II типа в сыворотке периферической крови проводили методом иммуноферментного анализа с помощью стандартных наборов (BlueGeneBiotech, China), согласно инструкции фирмы-производителя. Нижние пороги концентрации биомаркеров составили 0,1 пг/мл и 1,0 пг/мл соответственно.

Оценка уровня метилирования ДНК в МНК периферической крови проводилась с помощью мышиных моноклональных антител к 5-метилцитозину и вторичных козьих антител к тяжелым цепям мышиного IgG1, конъюгированных с FITC (Abcam). МНК ПК (10^6) фиксировались в 1% параформальдегиде в течение 10 минут при 37°C и держались на льду в течение 10 минут. Далее клетки инкубировали ночь с 88% метанолом при 20°C , центрифугировались в течение 5 минут, дважды отмывались 3ФР, содержащим 0,01% Твин 20 и 1 г/мл BSA. Затем клетки обрабатывали 1N HCl 40 минут при 37°C . Нейтрализация проводилась 0.1M боратым буфером. Далее клетки инкубировали 20 минут при 37°C с блокирующим раствором, 1 час с анти-5-цитозин моноклональными антителами при 37°C , дважды отмывались 3ФР и инкубировались с FITC-конъюгированными вторичными антителами 1 час при $22-24^\circ\text{C}$. Содержание 5-метилцитозина оценивалось как медиана интенсивности флуоресценции (MIF) в окрашенных образцах минус MIF в контроле.

Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) оценивали традиционным методом жидкостной хроматографии.

Описательная статистика представлена медианой (Me), 25 и 75 квартилями (Q_{25} , Q_{75}). Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали критерии Манна–Уитни.

Результаты

Ранее нами было показано, что больные ОА, клиническим и рентгенологическим проявлением которого предшествовал СД — это преимущественно женщины пожилого возраста с избыточной массой тела [32]. В отличие от пациентов ОА, не страдающих сахарным диабетом, они характеризуются более выраженным уровнем боли в суставах, большей продолжительностью утренней скованности, большим уровнем снижения функции опорных суставов и кисти, качества жизни и, как следствие всего перечисленного, большей тяжестью клинических проявлений ОА. Тяжелое течение артрита характерно для больных с плохо

контролируемым СД, принимающих препараты инсулина. Как сопутствующая патология, имеющаяся у пациентов обеих групп, усиливает бремя болезни у конкретного больного и каковы возможные последствия коморбидности в течение основного заболевания?

В таблице 1 представлены результаты оценки индексов коморбидности и бремени коморбидности, рассчитанных с помощью системы CIRS — G [26], предусматривающей возраст больного (табл. 1).

Из таблицы 1 следует, что число имеющих или перенесенных в прошлом заболеваний в обеих группах больных было достаточно велико и достоверно не различалось между группами. При этом по количеству пораженных анатомо-физиологических систем (респираторной, сердечно-сосудистой и др.) больные первой и второй групп также не отличались. Основное различие выявлено по степени тяжести коморбидности, которая была достоверно выше в группе больных ОАСД и обусловлена преобладанием в ней инвалидов

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КОМОРБИДНОСТИ В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ [Me (Q_{25} - Q_{75})]

Показатель	Больные ОА в сочетании с СД (n = 52)	Больные ОА (n = 26)	P
Число заболеваний	9 (5-12)	8 (8,7-11,2)	0,2
Число пораженных систем	6 (4-6)	7 (6-8,2)	0,2
Индекс коморбидности	9 (6-12)	9 (8-11,2)	0,98
Индекс тяжести коморбидности	1,8 (1,6-2)	1,3 (1,1-1,5)	0,001

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СОДЕРЖАНИЯ АГГРЕКАНА И АНТИТЕЛ К КОЛЛАГЕНУ II ТИПА В СЫВОРОТКЕ ПК БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРИТОМ [Me (Q_{25} - Q_{75})]

Биомаркер	Больные ОА в сочетании с СД (n = 52)	Больные ОА (n = 26)	P
Содержание антител к коллагену II типа (ng/ml) в сыворотке ПК (медиана и межквартильные интервалы)	5 (4-6)	4 (3-5)	0,004
Содержание агрекана (ng/ml) в сыворотке ПК (медиана и межквартильные интервалы)	0,4 (0,3-0,9)	0,2 (0,1-0,5)	0,006

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК В МНК ПК БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРИТОМ И ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ [Me (Q_{25} - Q_{75})]

	Больные ОА в сочетании с СД (n = 52)	Больные ОА (n = 26)	Здоровые люди (n = 11)	P между больными ОА и СД и больными ОА	P между больными ОА и СД и здоровыми людьми
Уровень метилирования	387 (213-518)	313 (187-508)	142 (126-165)	0,1	0,0001

по основному или сопутствующим заболеваниям, большим объемом комбинированной фармакотерапии пациентов этой группы.

В последние годы все большее внимание исследователей привлекает возможность оценки ранних изменений хряща при ОА, скорости их прогрессирования, тяжести деструкции, эффективности лечения и др. с использованием различных биомаркеров [7, 22]. К числу биомаркеров, характеризующих степень разрушения хряща у больных ОА, относят агрекан, коллаген II типа, его фрагменты и антитела к ним, олигомерный матриксный белок хряща (COMP) и ряд других.

В таблице 2 представлены данные о содержании агрекана и антител к коллагену II типа в сыворотке периферической крови больных ОА.

Видно, что в группе больных ОАСД уровень циркулирующего в периферической крови агрекана и антител к коллагену II были достоверно выше, чем в группе больных ОА. Содержание биомаркеров не было связано с уровнем гликемии.

Итак, у больных ДАОА, характеризующихся тяжелыми проявлениями суставного синдрома, выраженностью системного воспаления и повышенным уровнем тяжести коморбидности, в сыворотке крови определяется повышенное содержание биомаркера деструкции хрящевой ткани — протеогликана матрикса хряща агрекана, увеличение уровня антител к другому матриксному биомаркеру деструкции — коллагену II типа. Можно предположить, что выявленные изменения связаны с эпигенетическими нарушениями, в частности метилирования ДНК в клетках — эффекторах воспаления.

В таблице 3 представлены данные об уровне метилирования ДНК в МНК ПК здоровых людей и больных ОА. Установлено, что медиана уровня метилирования ДНК в МНК ПК здоровых людей в 2–2,5 раза ниже уровня метилирования больных ОА.

Различий в степени метилирования ДНК в группах больных ОА не выявлено.

Обсуждение

Результаты исследования выявили новые клинические и патогенетические характеристики описанного ранее субтипа ОА, ассоциированного с СД [32] — более выраженные клинические проявления суставного синдрома и наличия системного воспаления. В равной степени повышенные показатели коморбидности в сравниваемых группах и незначительно (0,5) более высокая тяжесть коморбидности у больных ДАОА свидетельствуют о том, что ОА, как и СД, являются заболеваниями, для которых характерна высокая частота

коморбидных заболеваний. Однако сочетание ОА и диабета не приводит к синергичному повышению риска коморбидности.

На фоне полипатии у пациентов с ДАОА регистрируется увеличение содержания в периферической крови биомаркеров разрушения хрящевой ткани: повышение уровня агрекана — продукта деградации матрикса хряща, а также увеличение содержания антител к другому матриксному компоненту деструкции — коллагену II. Напомним, что основное вещество хряща на 60–70% состоит из фибриллярного белка коллагена II типа, 10% составляют протеогликаны, среди которых 90% занимает агрекан [4, 5]. Агрекан, коллаген II типа — одни из первых белков, содержание которых уменьшается в суставном хряще при раннем ОА [5]. Инициация разрушения матрикса хряща обусловлена действием IL-1 β , TNF α , которые запускают каскад катаболических процессов с участием агрекиназ, коллагеназ, металлопротеиназ, синтетазы оксида азота, циклооксигеназы-2 [24]. Катаболические эффекты зависят не только от действия IL-1 и TNF, в них принимают участие и другие провоспалительные цитокины, адипокины (24), однако их роль изучена значительно хуже [4].

В последующем, при прогрессировании ОА, к некоторым эпитопам агрекана и коллагена II типа, фрагментам их деградации формируется гуморальный [19, 34] и Т-клеточный иммунный ответ [15], способствующий персистенции воспаления в суставном хряще и синовиальной ткани. Так, показано, что добавление в культуры бычьих хондроцитов антител к коллагену II и его фрагментам оказывает цитотоксическое действие, обусловленное внутриклеточной активацией металлопротеиназ [31]. Не все фрагменты коллагена II и агрекана являются аутоантигенами. В молекуле коллагена II выделяют «артрогенные эпитопы» [16], в структуре агрекана на эту роль претендует 846 эпитоп [23]. Следует помнить, что наряду с усилением катаболических процессов в хряще, обусловленных воспалением, при ОА снижаются и анаболические процессы [24], связанные с уменьшением синтеза хондроцитами агрекана, коллагенов, гиалуроновой кислоты и пр. Уменьшение анаболизма происходит также при участии цитокинов и адипокинов. Так, показано, что высокий уровень IL-18 в сыворотке крови способствует снижению синтеза ключевого протеогликана хрящевой ткани агрекана [20]. Развитие и исходы заболеваний человека, формирование их сочетаний, реализуются в соответствии с типовыми патологическими процессами (острое и хроническое воспаление, дистрофии и др.), их взаимными комбинациями [9]. Морфологической основой, объединяющей такую по-

липатию, как ОА в сочетании с СД, ожирением, атеросклерозом, другими заболеваниями, является системное воспаление [8]. Оно поддерживается многочисленными медиаторами воспаления [12, 21], участием клеток иммунной системы, жировой ткани, провоспалительный потенциал которых усиливается в результате изменений липидного и углеводного обмена, действием конечных продуктов гликирования, инсулинорезистентностью и др. [6, 13]. Предполагается, что именно системное воспаление увеличивает риск развития разнообразной воспалительной коморбидной патологии при ОА [2, 6, 8].

Ключевым патогенетическим звеном персистенции воспаления, объединяющим различные заболевания при полипатии, может быть нарушение функции эпигенома в клетках-эффекторах воспаления, в частности метилирования ДНК. Показано, что уровень метилирования ДНК в В-лимфоцитах и НК-клетках у больных ожирением и СД 2, значительно повышен [30]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что МНК ПК больных ОАСД и больных ОА без сопутствующего СД характеризуются более высоким, чем у здоровых людей, уровнем метилирования ДНК; у больных ОАСД это ассоциируется с увеличением степени деструкции хряща. Эти предварительные данные позволяют предполагать, что у больных остеоартритом в клетках разного гистогенеза (фагоцитирующие клетки, Т- и В-лимфоциты, адипоциты, хондроциты и др.) имеется дисбаланс процессов гипо- и гиперметилирования ДНК, приводящих к увеличению уровня провоспалительных и снижению противовоспалительных цитокинов, увеличению содержания растворимых рецепторов

цитокинов, изменению соотношения процессов катаболизма и анаболизма [10, 17]. Так, ранее нами показано, что в сыворотке периферической крови больных ОАСД повышено содержание провоспалительных (IL-6, IL-18) и снижено содержание противовоспалительных (IL-10, адипонектин) медиаторов [33].

Установлено, что промоторы некоторых генов хондроцитов, контролирующих экспрессию ряда металлопротеиназ, способствующих деградации хряща, гипометилированы [17], а ростового фактора OP-1, усиливающего анаболические процессы в матриксе хрящевой ткани – гиперметилированы [14].

В заключение следует отметить, что изучение механизмов эпигенетической регуляции системного воспаления, процесса разрушения хряща у больных остеоартритом, присоединения к основному заболеванию коморбидной патологии, находится только в начале своего пути. Эти механизмы необычайно сложны и связаны не только с нарушением метилирования ДНК, но и изменениями ацетилирования гистонов, функций микроРНК [14, 28, 29]. Можно надеяться, что благодаря исследованиям эпигенетической регуляции воспаления, метаболизма хрящевой ткани у больных ОА станет возможным идентификация новых терапевтических мишеней и разработка на их основе новых методов терапии не только основного, но и сопутствующих заболеваний. Актуальность проблемы коморбидности при ОА подчеркивается в последних согласительных рекомендациях OARSI [25] по ведению больных, предусматривающих обязательный учет коморбидности при назначении больным медикаментозных и немедикаментозных методов лечения.

Список литературы / References

1. Анкудинов А.С. Проблемы сердечно сосудистой коморбидности при остеоартрозе // Современные проблемы ревматологии, 2013. № 5. С. 22-31. [Ankudinov A.S. Problems cardiovascular comorbidity in osteoarthritis. *Sovremennyye problemy revmatologii = Modern Problems in Rheumatology*, 2013, no. 5, pp 22-31. (In Russ.)]
2. Беззьяков И.Г., Корж И.В. Остеоартроз, артериальная гипертензия и ожирение: проблемы коморбидности // Международный медицинский журнал, 2012. № 4. С. 78-81. [Bereznyakov I.G., Korzh I.V. Osteoarthritis, arterial hypertension, and obesity: comorbidity problem. *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal = The International Medical Journal*, 2012, no. 4, pp. 78-81. (In Russ.)]
3. Головкина Е. С. Течение гонартроза и коксартроза на фоне сахарного диабета // Боль. Суставы. Позвоночник, 2012, Т.4, № 8. С. 34-38. [Golovkina E.S. The course of gonarthrosis and coxarthrosis in patients with diabetes mellitus. *Bol'. Sustavy. Pozvonochnik = Pain. Joints. Spine*, 2012, Vol. 4, no. 8, pp. 34-38. (In Russ.)]
4. Голубев Г., Григштейн О. Молекулярная патология остеоартроза как основа для создания патогенетически обоснованной структурно-модифицирующей терапии // Международный журнал медицинской практики, 2005. № 2. С. 1-23. [Golubev, G., Grigshiteyn O. Molecular pathology of osteoarthritis as a basis for creating pathogenetically substantiated structural-modifying therapy. *Mezhdunarodnyy zhurnal meditsinskoy praktiki = International Journal of Medical Practice*, 2005, no. 2, pp. 1-23. (In Russ.)]
5. Дедух Н.В. Аггрекан // Боль, суставы, позвоночник, 2012. № 4 (8). С.10-13. [Dedukh N.V. Aggrecan. *Bol'. Sustavy. Pozvonochnik = Pain. Joints. Spine*, 2012, no. 4 (8), pp. 10-13. (In Russ.)]
6. Денисов Л.Н., Насонова В.А. Ожирение и остеоартроз // Научно-практическая ревматология, 2010. № 3. С.48-51. [Denisov L.N., Nasonova V.A. Ozhirenie i osteoartroz. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2011, no. 3, pp. 48-52. doi: 10.14412/1995-4484-2010-443 (In Russ.)]

7. Долгова Е.А., Сороцкая В. Н., Ракита Д.Р. Биомаркеры остеоартрита (обзор литературы) // Вестник новых медицинских технологий, 2012. Т. 19, № 1. С. 227-230. [Dolgova E.A., Sorotskaya V.N., Rakita D.R. Biomarkers of osteoarthritis (review). *Vestnik novykh meditsinskikh tekhnologiy = Journal of New Medical Technologies*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 227-230. (In Russ.)]
8. Наумов А.В., Верткин А.Л., Алексеева Л. И., Шамуплова М.М., Мендель О.А., Лучихина А.В. Остеоартроз и сердечно-сосудистые заболевания. Общие факторы риска и клинико-патогенетические взаимосвязи // Профилактическая медицина, 2010. № 3. С. 35-41. [Naumov A.V., Vertkin A.L., Alexeyev L.I., Shamuplova M.M., Mendel O.A., Luchikhina A.V. Osteoarthritis and cardiovascular diseases. Overall risk factors and clinical and pathogenetic relationships. Therapy optimization. *Profilakticheskaya meditsina = Preventive Medicine*, 2010, no. 3, pp. 35-41. (In Russ.)]
9. Саркисов Д.С., Пальцев М.А., Хитров Н.К. Общая патология человека. М.: Медицина, 1997. 608 с. [Sarkisov D.S., Paltsev M.A., Hitrov N.K. General human pathology]. Moscow: Medicine, 1997. 608 p.
10. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал, 2013. Т. 13, № 3. С. 18-41. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditsinskiy akademicheskij zhurnal = Medical Academic Journal*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 18-41. (In Russ.)]
11. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Коморбидные заболевания – актуальная проблема клинической медицины // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 1. С. 7-12. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Comorbid diseases as an important problem of clinical medicine. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 29, no. 1, pp. 7-12. (In Russ.)]
12. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthritis!). *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, no. 1, pp. 16-22.
13. Berenbaum F. Diabetes – induced osteoarthritis: from a new paradigm to a new phenotype. *Ann. Rheum. Diseases*, 2011, no. 8, pp. 1354-1356.
14. Chubinskaya S., Otten L., Soeder S., Borgia J.A., Aigner T., Rueger D.C., Loeser R.F. Regulation of chondrocyte gene expression by osteogenic protein-1. *Arthritis Res. Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 2, pp. 2-14.
15. de Jong H., Berlo S.E., Hombrink P., Otten H.G., van Eden W., Lafeber F.P., Heurkens A.H., Bijlsma J.W., Glant T.T., Prakken B.J. Cartilage proteoglycan aggregate epitopes induce proinflammatory autoreactive T-cell responses in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 1, pp. 255-262.
16. Goldberg V.M., Kresina T.F. Immunology of articular cartilage. *J. Rheumatol.*, 1987, Vol. 14, Spec no., pp. 73-76.
17. Goldring M.B., Kenneth B.M. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol. Med.*, 2012, vol. 18, no. 2, pp. 109-118.
18. Gonzales A. Osteoarthritis year 2013 in review: genetics and genomics. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 10, pp. 1443-1451.
19. Guo Hua Yuan. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 2003, Vol. 48, pp. 602-611.
20. Inoue H., Hiraoka K., Hoshino T., Okamoto M., Iwanaga T. High levels of serum IL-18 promote cartilage loss through suppression of aggrecan synthesis. *Bone*, 2008, Vol. 32, no. 6, pp. 1102-1110.
21. Kappor M., Martel-Pelletier J., Lajenesse P., Pelletier J.P., Fachmi H. Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2011, Vol. 7, no. 1, pp. 33-42.
22. Lafeber F.P., van Spil W.E. Osteoarthritis year 2013 in review: biomarkers; reflecting before moving forward, one step at a time. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 10, pp. 1452-1464.
23. Lohmander L.S., Ionescu M., Jugessur H., Poole A.R. Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis. *Arthritis Rheum.*, 1999, Vol. 42, no. 3, pp. 534-544.
24. Louser R.F. Osteoarthritis year in review 2013: biology cartilage. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 10, pp. 1436-1442.
25. McAlindon T.E., Bannuru R.R., Sullivan M.C., Arden N.K., Berenbaum F., Bierma-Zeinstra S.M., Hawker G.A., Henrotin Y., Hunter D.J., Kawaguchi H., Kwoh K., Lohmander S., Rannou F., Roos E.M., Underwood M. OARS guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, Vol. 22, no. 3, pp. 363-388.
26. Miller M.D., Paradis C.F., Honck P.R., Mazumdar S., Stack J.A., Rifai A.H. Rating chronic medical illness burden in geropsychiatric practice and research application of the Cumulative illness Rating Scale. *Psychiatry Res.*, 1992, Vol. 41, no. 3, pp. 237-244.
27. Pöschl E., Fidler A., Schmidt B., Kallipolitou A., Schmid E., Aigner T. DNA methylation is not likely to be responsible for aggrecan down regulation in aged or osteoarthritic cartilage. *Ann. Rheum Dis.*, 2005, Vol. 64, no. 3, pp. 477-480.
28. Roach H.I., Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, no. 15, pp. 128-137.
29. Roach H.I., Yamada N., Cheung K.S., Tilley S., Clarke N.M., Oreffo R.O., Kokubun S., Bronner F.H., Yamada N., Cheung K.S., Tilley S., Clarke N. M., Oreffo R.O., Kokubun S., Bronner F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.*, 2005, Vol. 52, no. 10, pp. 3110-3124.

30. Simar D., Verstehey S., Donkin I., Liu J., Hesson L., Nylander V., Fossum A., Barrès R. 'DNA methylation is altered in B and NK lymphocytes in obese and type 2 diabetic human. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2014, Vol. 63, no. 9, pp. 1188-1197.
31. Takagi T., Jasin H. Interactions of synovial fluid immunoglobulins with chondrocytes. *Arthritis Rheum*, 1992, no. 12, pp. 1502-1509.
32. Trifonova E.P., Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Shirinsky V.S. Clinical and laboratory features of diabetes-associated knee osteoarthritis: a case control study. *Ann. Rheum. Dis.*, 2014, Vol. 73, Suppl. 2. 253 p.
33. Trifonova E.P., Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Shirinsky V.S., Kalinovskaya N.Y. Clinical and laboratory correlates of diabetes-induced knee osteoarthritis severity. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Vol. 72, Suppl. 3. 971 p.
34. Vynios D.H., Tsagaraki I., Grigoreas G.H., Samiotakis M., Panayotou G., Kyriakopoulou D., Georgiou P., Korbakis D., Panayotou A., Nanouri K., Assouti M., Andonopoulos A.P. Autoantibodies against aggrecan in systemic rheumatic diseases. *Biochimie*, 2006, no. 7, pp. 767-773.

Авторы:

Ширинский И.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сазонова О.В. — к.м.н., доцент, кафедра внутренних болезней, Новосибирский государственный медицинский университет; заведующая Городским диабетологическим центром, г. Новосибирск, Россия

Калиновская Н.Ю. — к.м.н., научный сотрудник, лаборатория клинической иммунофармакологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Ширинский В.С. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shirinsky I.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sazonova O.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Internal Medicine, Novosibirsk State Medical University; Head, Novosibirsk City Diabetic Center, Novosibirsk, Russian Federation

Kalinovskaya N.Yu., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shirinsky V.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 14.05.2015

Отправлена на доработку 25.06.2015

Принята к печати 30.06.2015

Received 14.05.2015

Revision received 25.06.2015

Accepted 30.06.2015

ИММУНОЭПИТОПНЫЙ КОНТИНУУМ РОДСТВА БЕЛКОВ, ПОЛИРЕАКТИВНОСТЬ И АУТОРЕАКТИВНОСТЬ АНТИТЕЛ

Харченко Е.П.

ФГБУН «Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Компьютерный анализ первичных структур более 3300 белков показал возможность существования глобального иммуноэпитопного континуума родства белков (ИЭКРБ) эукариот, прокариот и вирусов. На основе ИЭКРБ можно дать новые трактовки различных феноменов ИС и, в частности, рассматривать его как дополнительный фактор, обуславливающий полиреактивность и аутореактивность антител, и, соответственно, расширить концепцию о регуляторной функции естественных антител. В практических медицинских приложениях опора на существование ИЭКРБ была бы особенно полезной в случае поиска вакцин и иммунодиагностикумов.

Ключевые слова: белки, эпитопы, антитела, иммунная регуляция, иммунная толерантность, вакцины

IMMUNE EPITOPE CONTINUUM OF THE PROTEIN RELATIONSHIPS, POLY- AND AUTOREACTIVITY OF ANTIBODIES

Kharchenko E.P.

I. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Computer analysis of primary structure for >3300 proteins has shown an opportunity for existence of global immune epitope continuum of protein relationships (IECPR) for eukaryotes, prokaryotes, and viruses. On the basis of IECPR, one may provide new interpretations for immune events, and in particular, to consider them as an additional factor determining poly- and autoreactivity of antibodies, and, respectively, extend the concept of regulatory functions of natural antibodies. For medical practice, the IECPR would be especially useful in cases of search for novel vaccines and immune diagnostic preparations.

Keywords: proteins, epitopes, antibodies, immune regulation, immune tolerance, vaccines

Адрес для переписки:

Харченко Евгений Петрович
ФГБУН «Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН
194223, Россия, Санкт-Петербург, пр. Тореца, 44.
Тел.: 8 (904) 338-22-80.
E-mail: neuro.children@mail.ru

Address for correspondence:

Kharchenko Yevgeny P.
Research Institute of Experimental Medicine
194223, Russian Federation, St. Petersburg,
Prospekt Toreza, 44.
Phone: 7 (904) 338-22-80.
E-mail: neuro.children@mail.ru

Образец цитирования:

Е.П. Харченко, «Иммуноэпитопный континуум родства белков, полиреактивность и аутореактивность антител» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 335–346.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-335-346

© Харченко Е.П., 2015

For citation:

E.P. Kharchenko, "Immune epitope continuum of the protein relationships, poly- and autoreactivity of antibodies", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 335–346. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-335-346

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-335-346>

Посвящается памяти И.П. Ашмарина

Введение

Современные методы исследования открывают нам новые характеристики компонентов и процессов иммунной системы (ИС) и позволяют глубже понять их взаимную обусловленность. Рассмотрим, к примеру, два известных феномена ИС: полиреактивность и аутореактивность антител (Ат) и центральные механизмы формирования толерантного репертуара Т-клеток в тимусе.

Антитела, представленные 5 классами иммуноглобулинов (Ig), синтезируются разными линиями В-клеток и их индукция реализуется различными механизмами. В противоположность В2-клеткам, осуществляющим тимус-зависимый (иммуногенный) синтез Ig с более высокой специфичностью и переключение синтеза с IgM на IgG, В1-клетки секретируют преимущественно IgM без гипермутирования зародышевых генов Ig, а сам синтез Ig является спонтанным и конститутивным и независимым от Т-клеток, что обусловило их название — естественные Ат (ЕА). Независимо от их источника общим свойством Ig являются полиреактивность и аутореактивность, особенно в случае ЕА [31]. Еще 30 лет назад было признано, что и моноклональные Ат всегда полиспецифичны [36]. Соответственно, возникает вопрос: обусловлена ли полиаутореактивность Ат только их конформационной мобильностью или она определяется также свойствами самих белков, с которыми они наиболее часто взаимодействуют. Эта проблема остро стоит в случае поиска вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), поскольку необходимые Ат с широким спектром нейтрализации вируса оказываются полиаутореактивными [15].

В организме центральные механизмы обеспечения ауто толерантного репертуара Т-клеток ИС основаны на положительной и отрицательной селекции Т-лимфоцитов в тимусе в процессе взаимодействия Т-клеточных рецепторов с главными комплексами гистосовместимости (МНС) классов I и II, загруженными пептидами (П) из белков, синтезированных в клетках тимуса. Следуя [41], эти П будут далее в контексте ИС именоваться также иммунными эпитопами (ИЭ). Сравнительно недавно установлено, что источником большинства ИЭ в тимусе является экспрессия в медуллярных эпителиальных клетках генов различных органов и тканей, названная беспорядочной экспрессией генов [12, 24]. Она осуществляется под контролем транскрипционного регулятора AIRE (от autoimmune regulator). В совокупности с базальной экспрессией генов самих этих клеток и других клеток тимуса (корковых

эпителиальных клеток, макрофагов и дендритных клеток) она служит источником ИЭ примерно из 2000–3000 белков разных органов и тканей, гены которых охватывают до 5% генома [12, 24]. Однако, не ясно, как экспрессия лишь малой части генома определяет в онтогенезе у млекопитающих единовременную ауто толерантность к большинству белков организма.

При ограниченности числа аллелей МНС у индивидуума и огромном множестве ИЭ распознавание их на уровне МНС априорно является сильно вырожденным. Первичные структуры ИЭ, связывающиеся с одним аллелем МНС, составляют мотив. В пределах мотива первичные структуры ИЭ существенно варьируют, и их родство к конкретному аллелю МНС обусловлено наличием в определенных позициях их первичной структуры якорных аминокислот, которыми они связываются с полостью МНС. Размеры ИЭ, распознаваемых МНС I и II, заметно отличаются, составляя, соответственно, 8–10 и 13–24 аминокислот. Не определяют ли размеры ИЭ особенности селекции CD4 и CD8 Т-лимфоцитов в тимусе и, соответственно, механизмы ауто толерантности? Не исключено, что между белками существует пептидный континуум родства (ПКРБ) и его частным проявлением служит иммуноэпитопный континуум родства белков (ИЭКРБ). Применительно к CD8 Т-лимфоцитам он мог бы проявляться в рассеивании в первичных структурах белков родственных нонапептидов (P₉) по принципу: один и тот же мотив родственных P₉ содержится во множестве разных белков, и каждый белок содержит множество разных мотивов ИЭ. Это позволило бы обеспечить презентацию большинства линейных ИЭ в белках экспрессирования в клетках тимуса малой части генома и, соответственно, селектировать подавляющее большинство аутореактивных клеток. Поскольку CD4 Т-лимфоцитами распознаются более длинные ИЭ, то очевидно, что вероятность селекции всех аутореактивных CD4 Т-лимфоцитов, например по P₁₄, на уровне тимуса, по сравнению с CD8 Т-лимфоцитами, будет меньшей, и их нейтрализация должна бы реализоваться периферическими механизмами толерантности.

Цель настоящего исследования состояла в выявлении с помощью компьютерного анализа существования (на уровне P₉ и P₁₄) ПКРБ для организмов различных ступеней эволюционного развития, рассматривая его как основу для ИЭКРБ и объясняя им не только особенности центральных механизмов толерантности, но и полиаутореактивность Ig, особенно ЕА. 25 лет назад Ашмариным И.П. и Фрейдлином И.С. [1] была высказана плодотворная гипотеза о регуляции физиологических функций ЕА. Позднее другие исследователи [4, 22] экспериментально

обосновали существование обязательного аутореактивного репертуара Ig, В- и Т-клеток и участие их в клеточном гомеостазе организма, противостоянии патогенам и патологических процессах. В рамках развиваемой концепции ИЭКРБ дополнительно рассматривается возможность проявления сетевой регуляции разных функций посредством Ig.

Материалы и методы

Для компьютерного анализа были использованы последовательности 3150 белков человека, охватывающие все ткани и органы, клеточные органеллы и межклеточное вещество, ферменты путей синтеза и метаболизма. В анализ были включены также 14 белков беспозвоночных (*Drosophila melanogaster*), 61 белок из 6 прокариот (*Escherichia coli*, *Bordetella pertussis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycoplasma hominis*, *Chlamydia trachomatis*) с разным содержанием ГЦ-пар в их геномах и 102 белка из 19 РНК- и ДНК-содержащих вирусов (ВИЧ, вирус гриппа, гепатитов А, В и С, кори, паротита, краснухи, полиомиелита, клещевого энцефалита Денге, Эбола, бешенства, желтой лихорадки, цитомегаловирус, аденовирус, вирус папилломы, простой герпес, синцитиально-респираторный вирус). Источником первичных структур белков служили доступные по Интернету базы данных (www.ncbi.nlm.nih.gov, www.nextprot.org, <http://viralzone.expasy.org>). Аргументация существования ИЭКРБ строилась на основе того, что совокупность ИЭ белков в организме является подмножеством множества всех возможных в белках пептидных фрагментов, равных по длине ИЭ. Поэтому необходимым условием для существования ИЭКРБ является существование ПКРБ. Для МНС I в качестве стандарта обычно принимается ИЭ длиной в 9 аминокислот (P_9), поэтому анализ в контексте Т-клеточного иммунитета был сосредоточен на выявлении P_9 -КМРБ. Так как первичная структура ИЭ в пределах каждого мотива может значительно варьировать, то условно родственными P принимались те из них, которые проявляли идентичность аминокислот по 5-9 позициям. Поскольку полость МНС II вмещает лишь P длиной в 13-14 аминокислот и концы P большей длины провисают вне торцов полости, не участвуя в иммунном узнавании, то применительно к МНС II анализировались лишь P длиной в 14 аминокислот (P_{14}) и условно родственными принимались те из них, что проявляли с P_{14} в других белках идентичность по 8-14 позициям. Для каждого белка в случае МНС I за общее число возможных в нем ИЭ принималась длина L белка, уменьшенная на 8, в случае же МНС II она уменьшалась на 13.

Для каждого белка подсчитывалось число (N) тех $P_{9(14)}$, к которым были обнаружены родственные $P_{9(14)}$ во всех других белках базы данных, и уровень родства между сравниваемыми $P_{9(14)}$ (т.е. число идентичных в них позиций аминокислотных остатков). В качестве одного из показателей (в %) родства (связности) каждого белка с другими белками по P_9 принималась величина $K = 100 \cdot N / (L - 8)$, а по P_{14} — соответственно, $K = 100 \cdot N / (L - 13)$. Среднее (K_{cp}) значений K всех белков базы данных, соответственно, по P_9 и P_{14} принималось за общую меру P_9 -КРБ и P_{14} -КРБ. Другим показателем, характеризующим связность каждого белка в ИЭКРБ, являлось число C других белков, в которых были обнаружены родственные $P_{9(14)}$ для данного белка.

Результаты

Выполненный анализ выявил P_9 -КРБ для белков человека и представителей из других таксонов. Проанализированные белки вне зависимости от их функционального назначения и таксономической принадлежности имели $K = 100\%$ с протеомом человека, и, соответственно, показатель связности для всех белков K_{cp} по P_9 достигал 100%. Примечательно, что в каждом белке все его P_9 имели по множеству «родственников» в других белках, и это может служить основой для поддержания в организме физиологического аутоотолерантного репертуара CD8 Т-лимфоцитов. Условием признания гомологичности (родства) P_9 было наличие у них не менее 5 идентичных аминокислот в самых различных позициях и их комбинациях. Неожиданностью оказалась не редкая встречаемость пар родственных P_9 с идентичными блоками длиной в 7-8 аминокислот, не говоря уже об идентичных блоках длиной в 5-6 аминокислот. Таблицы 1-3 иллюстрируют лишь некоторые примеры идентичных блоков в 7-8 аминокислот у сывороточного альбумина и разных белков ВИЧ1 и штамма вируса гриппа А H1N1 пандемии 2009 г. Столь протяженные идентичные последовательности в белках организмов разных таксонов трудно объяснить независимым их происхождением на разных ступенях эволюционного развития, но они вполне возможны за счет наследования существовавших у эволюционных предшественников блоков белков, чему способствует разорванность в организации генов эукариот в виде интронов и экзонов.

Что касается P_{14} -КРБ, то для него уровень связности белков K_{cp} имел меньшие значения, чем для P_9 -КРБ, — ~64% (интервал варьирования 32-99%). Значение C , отражающее для каждого белка число белков, с которыми он обнаруживал родство по P_{14} , варьировало от 32 до 1100. Для P_9 -КРБ значения C были существенно выше. В та-

ТАБЛИЦА 1. ПРИМЕРЫ ФРАГМЕНТОВ ЧЕЛОВЕЧЕСКОГО СЫВОРОТОЧНОГО АЛЬБУМИНА, ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В ДРУГИХ БЕЛКАХ

Названия пар белков с указанием позиций идентичных фрагментов в них	Общий идентичный фрагмент
Сывороточный альбумин (458-464) Белок р21 вируса гепатита С (115-121)	SRNLGKV
Сывороточный альбумин (296-302) Афамин (292-298)	QDSISSK
Сывороточный альбумин (48-54) Церамидглюкозилтрансфераза (226-232)	LIAFAQY
Сывороточный альбумин (45-51) Макросиалин (335-341)	ALVLIAF
Сывороточный альбумин (166-172) Альфа-фетопротеин (164-170)	YEIARRHP
Сывороточный альбумин (330-336) Белок, подобный рецептору ФР* (431-437)	DLPSLAA
Сывороточный альбумин (259-265) Вакуолярный белок (459-465)	VSKLVTD

Примечание. * – ФРФ – фибробластный фактор роста.

ТАБЛИЦА 2. ПРИМЕРЫ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКОВ ВИРУСА ГРИППА А, ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В БЕЛКАХ ЧЕЛОВЕКА

Названия пар белков с указанием позиций идентичных фрагментов в них	Общий идентичный фрагмент
Гемагглютинин вируса гриппа А (440-447) Мышечный белок титин (3707-3714)	AELLVLE
Нуклеопротеин вируса гриппа А (88-94) Мышечный белок титин (2903-2909)	DPKKTGG
Белок РВ1 вируса гриппа А (584-590) Основной белок Y2 яичек (63-69)	QSKVGLL
Белок РВ2 вируса гриппа А (580-586) Калирин (274-280)	FQSLVPK
Белок РВ2 вируса гриппа А (682-688) Глипиан-1 (306-312)	GTSGVES
Белок РА вируса гриппа А (397-403) Септин-8 (13-19)	EPEPRSL
Белок РА вируса гриппа А (131-137) Дистрофин (1274-1280)	YLEKANK

таблице 4 приводится фрагмент данных анализа этих показателей по трем белкам человека: одного из наиболее консервативных в эволюции белка – гистона Н4, имеющего малую длину, сывороточного альбумина, имеющего наиболее часто встречающуюся длину белков, и тиреоглобулина, как представителя крупных белков. В нее включены также данные по вирусным белкам.

Из таблицы 4 видно, что в белках значения N, C и количества в Π_{14} идентичных аминокислот коррелировали с длиной L белка. Хотя приведенные в таблице 4 белки не содержат Π_{14} с идентичностью по 13 и 14 позициям, встречаемость таких Π_{14} среди белков использованной базы данных не была редкостью. Как и следовало ожидать, разнообразие и число мотивов ИЭ(П) в белках

определялись в значительной мере их длиной и, соответственно, наиболее крупные белки (например, тяжелая цепь миозина, тиреоглобулин, дистрофин) отличались наиболее сильной связностью, охватывая «родственностью» все тестируемые нами белки, что иллюстрируется в таблице 4 на примере тиреоглобулина. Если у исследованных вирусных белков значение K по Π_9 -КРБ относительно белков человека было максимальным – 100%, то по Π_{14} -КРБ значение K было значительно меньше K_{cp} для самих белков человека. Для гемагглютинина вируса гриппа А он составлял 44%, для gp160 гликопротеина ВИЧ I – 37% и для полипротеина вируса гепатита С – 50%, что свидетельствует об их выраженной чужеродности для организма хозяина.

ТАБЛИЦА 3. ПРИМЕРЫ ФРАГМЕНТОВ БЕЛКОВ ВИЧ1, ОБНАРУЖИВАЕМЫХ В БЕЛКАХ ЧЕЛОВЕКА

Названия пар белков с указанием в них позиций идентичных фрагментов	Последовательность общих идентичных фрагментов
Гликопротеин gp120 ВИЧ1 (318-324) Убиквилин-4 (298-304)	REQFGNN
Гликопротеин gp120 ВИЧ1 (446-452) Ацетил-КоА-тиоэстераза 4 (328-334)	NWRSELY
Гликопротеин gp41 ВИЧ1 (128-134) Нефроцистин-4 (800-806)	TSLIHSL
Капсидный белок р24 ВИЧ1 (204-211) Белок ig-h3, индуцируемый ТРФβ (15-22)	ALGPAATL
Обратная транскриптаза ВИЧ1 (300-307) Белок 1 ядерного миотического аппарата (234-241)	ELELAENR
Белок nef ВИЧ1 (62-68) Плектин (773-779)	EEEEVGF
Белок vif ВИЧ1 (148-154) Энзим E2J1, конъюгирующий убиквитин (296-302)	LALAALI

Схематично фрагмент ИЭКРБ (или ПКРБ) по Π_9 (или Π_{14}) можно представить в виде графа (см. рис. 1), узлами которого (точки на графе) являются сами белки.

Каждый узел (белок) в графе может быть идентифицирован длиной (L) белка либо его первичной структурой. Соединяющие узлы графа ребра указывают на наличие у них родственных Π (или ИЭ), а числовые значения N над ребрами (на рисунке 1 в качестве примера условно представлены N только на двух ребрах) отражают число таких родственных Π_9 (или Π_{14}) у соответствующей пары белков. Очевидно, что число ребер (их плотность) в графе для Π_9 будет существенно выше, чем в графе для Π_{14} . Полезность такого представления ИЭКРБ в виде математического объекта в компьютерном исполнении заключается не только в наглядности, но и в том, что оно позволяет прогнозировать сложную сеть перекрестных реакций Ат и иммунорегуляторную связность белков.

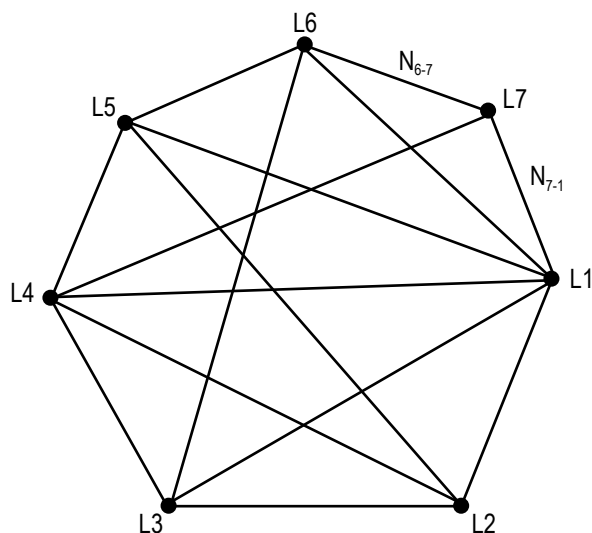


Рисунок 1. Схематичное представление ИЭКРБ в виде графа

ТАБЛИЦА 4. ХАРАКТЕРИСТИКИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ Π_{14} В НЕКОТОРЫХ БЕЛКАХ ЧЕЛОВЕКА И ВИРУСОВ

Белки	L	N	C	Число родственных Π_{14}						
				8*	9*	10*	11*	12*	13*	14*
Гистон H4	103	56	61	210	7	0	0	0	0	0
Альбумин сывороточный	620	324	154	418	50	23	6	4	0	0
Тиреоглобулин	2768	1290	870	2564	151	31	11	6	0	0
Гемагглютинин вируса гриппа А	566	244	168	418	38	3	0	0	0	0
Гликопротеин gp160 ВИЧ1	857	316	260	572	18	0	0	0	0	0
Полипротеин вируса гепатита С	3011	1486	1109	3917	298	21	0	0	0	0

Примечание. L – длина белка в аминокислотах, %. N – число Π_{14} в белке, к которым обнаружены родственные Π_{14} в других белках. C – число других белков, в которых обнаружены родственные Π_{14} для данного белка. * – количество идентичных аминокислот в родственных Π_{14} .

Обсуждение

Оценивая результаты выполненного анализа, можно утверждать, что они не противоречат гипотезе о существовании среди экспрессируемых в клетках тимуса белков ПКРБ, в рамках которого мог бы реализоваться ИЭКРБ для обеспечения центральных механизмов ауто толерантности ИС как в контексте МНС I, так и МНС II. Выявленные ПКРБ и как его частное проявление ИЭКРБ побуждают обсудить их в двух аспектах. Первый из них связан с возникновением и формированием ПКРБ и его проявлением в ИЭКРБ, второй — с возможными проявлениями ИЭКРБ и медицинскими его приложениями

Что касается возникновения и формирования ПКРБ, то следует заметить, что реализованное в эволюции многообразие белковых последовательностей существенно меньше потенциально возможного, что, по-видимому, объясняется происхождением ныне существующих белков из сравнительно небольшого числа предковых генов. Принципиально важным моментом в механизмах возникновения разнообразия белков является то, что в числе основных способов увеличения размеров и числа белков оказались генные дубликации и мозаичные комбинации, причем большинство генов белков являются разорванными и составленными из разного числа экзонов и интронов. Сопоставление первичных структур ряда белков показало, что они обнаруживают блочное родство, т.е. их последовательности родственны не по всей длине, а лишь по отдельным протяженным блокам, причем разветвленная сеть блочного родства охватывает белки, глубоко различающиеся по своим функциям. Соответствие размеров экзонов в разорванных генах функциональным доменам белков дает основание полагать, что полипептиды представляют собой набор фрагментов с различными функциями, которые эволюция по непонятным пока правилам собирает как одно структурно-функциональное целое [2]. ИЭ не являются каким-то обособленным подмножеством пептидных фрагментов белков, и их рассеянность и повторяемость в разных белках лишь отражает особенности возникновения и эволюции белков.

Адаптивная ИС (АИС) возникла на уровне позвоночных, намного позднее формирования основных функциональных систем и вовлеченных в них белков. Предсуществование глобального ПКРБ, охватывающего организмы разных ступеней эволюционного развития, обрекло АИС формироваться и функционировать на предуготовленном ей ИЭКРБ, который вносит важный вклад в такие проявления Ig, как полиреактивность и аутореактивность в отношении белков. Полиреактивность Ig и существование самого ИЭКРБ по существу является

проявлением функциональной вырожденности. В широком аспекте функциональная вырожденность определяется как способность элементов, которые структурно различны, выполнять одинаковые функции либо определять одно и то же состояние. В случае же выполнения одной и той же функции структурно идентичными элементами говорят об избыточности. Особенность функциональной вырожденности заключается в том, что она может реализовываться в одной и той же либо другой функции в зависимости от контекста, в котором она реализуется [13]. Она пронизывает все уровни биологической организации, и ее ярким примером является, конечно, вырожденность генетического кода. Она составляет также основу функционирования и врожденной, и адаптивной ИС.

Конечно же, полиспецифичность не является привилегией Ig в ИС. Любой ИЭ может быть распознан Т-клеточными рецепторами нескольких клонов лимфоцитов, в то же время любой клон лимфоцитов способен распознавать множество ИЭ [9, 14, 26, 37, 42]. Открытие семейства TLR, на первый взгляд, решало для иммунологов проблему, связанную с распознаванием «своего» от «несвоего» врожденной ИС, согласуясь с концепцией существования в ее клетках рецепторов к молекулярным инвариантам (липополисахаридами, теихоевые кислоты, их нуклеиновые кислоты, формилметиониловые пептидные фрагменты, маннаны, пептидогликаны) отдельных таксонов микроорганизмов [18]. Но впоследствии реальность оказалась весьма сложной и неопределенной, поскольку открытые вслед за семейством TLR цитозольные семейства RLR и NLR, как и другие ассоциированные с мембранной рецепторы (лектины, маннозный рецептор и Дектин I), CD14 (липополисахаридсвязывающий белок), пептидогликанраспознающие белки, также важны для распознавания широкого круга патогенов [10]. Кроме того, представления о специализации распознающих патоген-ассоциированные паттерны рецепторов подрываются тем, что как Toll-подобные, так и NLR рецепторы могут быть активированы и ингибированы удивительно широким спектром молекул. Для наиболее подробно изученных TLR2 и TLR4 число таковых для каждого из них составляет несколько десятков, причем некоторые из них оказываются общими для обоих рецепторов, а источниками их служат вирусы, прокариоты, растения, животные (включая множество белков хозяйского организма) либо синтетические производные [19]. Комбинированная активация TLR может повлечь разные эффекты: комплементарные, синергетические и антагонистические [20, 27].

То, что для P_9 -КРБ и P_{14} -КРБ и соответствующим им ИЭКРБ характерна разная степень



Рисунок 2. Некоторые возможные проявления ИЭКРБ

связности белков по ИЭ, можно было бы объяснить прежде всего различиями размеров P_9 и P_{14} и, соответственно, большим отражением в P_{14} уникальности первичных структур белков. Естественно задать вопрос: нужен ли более высокий уровень связности ИЭ в белках в рамках P_{14} -КРБ? Учитывая, что циркулирующие клетки ИС с регуляторными функциями способны осуществлять надзор за аутореактивными клетками на периферии, что часть белков скрыта в тканях, не поступая в циркуляцию, и ряд органов (например, мозг, печень, яички, ногти) обладает иммунной привилегией, достижение максимального уровня охвата ИЭ в P_{14} -КРБ было бы излишеством, чего природа всегда избегает. При максимальном уровне связности белков по P_{14} -КРБ узнавание «не своего» было бы затруднительным и даже невозможным. Присутствие в организме аутореактивных как ЕА, так Т- и В-клеток, характерно и считается даже обязательным практически для всех здоровых лиц с самого рождения [5, 23] и сегодня не рассматривается как несомненный маркер развивающегося аутоиммунного процесса. Им отводится важная роль в поддержании тканевого гомеостаза и активном участии в очищении организма от отмирающих под воздействием разных механизмов [40].

Сводка некоторых возможных проявлений ИЭКРБ в функционировании ИС приведена

на рисунке 2, и далее по ним будут приведены короткие комментарии.

Приступая к этой части обсуждения, следует подчеркнуть, что толерантность ИС является сложным механизмом, слагаясь из соучастия различных процессов на разных уровнях. Кроме того, существующая парадигма о селекции в тимусе Т-лимфоцитов, обладающих низкой аффинностью к комплексам МНС-П, и поддержании через нее физиологического аутоотолерантного репертуара CD4 и CD8 Т-лимфоцитов нуждается в расширении, поскольку не объясняет существование минорных линий (среди которых линия Т-регуляторных клеток) лимфоцитов, формирующихся также в тимусе и обладающих таким общим свойством, как необходимость в сильной активации их Т-клеточных рецепторов, реализуемой их высокой аффинностью к комплексам МНС-П [35]. Хотя бы поэтому автор далек от мысли дать на основе ИЭКРБ исчерпывающее объяснение рассматриваемых ниже феноменов.

Возвращаясь к поставленному вопросу относительно достаточности 2000-3000 белков в медуллярных эпителиальных клетках тимуса как источников ИЭ для реализации центральных механизмов аутоотолерантности, можно полагать, что, учитывая как проявление нормы наличие в циркуляции определенной доли аутореактивных клеток, P_9 -КРБ белков позволяет обеспе-

читать организм в основном аутоотолерантным репертуаром Т-CD8 лимфоцитов. Очевидно лишь то, что «неполнота» связности по P_{14} -КМРБ не противоречит возникновению аутоиммунных состояний. Наличие же аутореактивных клеток в циркуляции наиболее вероятно прежде всего из-за «неполноты» охвата всех ИЭ. Это подтверждается при паранеопластической нейродегенерации, проявляющейся неврологическими нарушениями, которые развиваются у пациентов со злокачественными опухолями (чаще всего при раке молочной железы и яичников, мелкоклеточном раке легких) и обусловлены эффективным противоопухолевым иммунным ответом против антигенов (Аг) раковых клеток, которые в норме экспрессируются исключительно в мозгу. Их обозначают как онконейральные Аг. Индуцированный онконейральными Аг иммунный ответ нередко супрессирует рост опухоли. Успешный иммунный ответ и сами опухоли не были бы замечены, если бы иммунные клетки, первоначально распознающие онконейральные Аг в опухоли, не проникали бы в мозг, вызывая аутоиммунную реакцию против нейронов, экспрессирующих те же Аг, что и возникшая опухоль, и соответствующую неврологическую симптоматику [3, 30].

Онкогенез сопровождается появлением трех типов Аг в опухоли: «неоАг», «модифицированных аутоАг» и собственных Аг (маркеры пролиферации и дифференциации, экспрессируемые обычно в эмбриогенезе). Ответ на них ИС часто оказывается слабым и неэффективным для подавления опухоли. Одним из объяснений этому может служить обретение опухолью механизмов избегания и супрессии ИС и отсутствием соответствия Аг опухоли критериям иммуногенности [29]. Но следует иметь в виду прежде всего то, что рак развивается как часть своего, и в организме разворачиваются различные сценарии взаимодействия опухоли и ИС, обусловленные эпигенетическими наслоениями, самой локализацией (происхождением) опухоли и тем, в какой степени ИЭ ассоциированных с опухолью Аг представлены в ИЭКРБ до возникновения опухоли.

Проявление ИЭКРБ при инфекциях не будет простым и однонаправленным и зависит от отношения патоген-хозяин. Одни инфекционные агенты «приходят и уходят», оставляя пожизненный иммунитет, другие, как, например, вирус гриппа, многократно «приходят и уходят», преодолевая временный иммунитет к ним благодаря быстрому мутированию их генома. Возбудители хронических инфекций «вторгаются и поселяются», вызывая в организме, как в случае ВИЧ или вируса гепатита С, необратимые или трудно обратимые состояния, не контролируемые ИС. Одной из причин этого может служить то, что инфекционный патоген наделен специальными механизмами, позволяющими ему избегать ИС хозяина. Другая причина связана непосредствен-

но с ИЭКРБ. В частности, максимальный уровень связности вирусных белков с белками человека по P_9 должен бы обуславливать слабую «видимость» их для CD8 Т-лимфоцитов, поскольку из организма элиминируются способные к их распознаванию CD8 Т-лимфоциты, и лишь частичную распознаваемость P_{14} как чужеродных CD4 Т-лимфоцитами. Это находится в согласии с данными о формировании стойкого иммунитета к вирусам, которые «поражают и уходят», за счет гуморального иммунитета [28], опосредуемого, как известно, через участие CD4 Т-лимфоцитов, и с коллизиями при поиске вакцин, способных индуцировать наряду с гуморальным иммунитетом CD8 клеточный ответ. Эти поиски остаются безуспешными против тех вирусов, которые «вторгаются и поселяются», (в частности против ВИЧ), т.е. патогенов, вызывающих хронические инфекции. Лишь частичная распознаваемость ИЭ вирусных белков как чужеродных CD4 Т-лимфоцитами сужает их потенциал реагирования и объясняет феномен иммунной доминантности в аспекте способности ИС реагировать лишь на малую долю ИЭ из их большого множества.

В этой связи нельзя не заметить, что в контексте гипотезы об ИЭКРБ выбор P из протеома патогена в качестве потенциальных кандидатов вакцин уже на самых ранних этапах эксперимента должен быть обоснован хотя бы тем, что они не охвачены ИЭКРБ. Кажущаяся с первого взгляда привлекательной идея создания клеточных вакцин, специфичных к строго определенному набору ИЭ, чревата опасностью из-за возможности индукции ими аутоиммунной реакции у реципиента. В русле «здравого смысла» кажутся и попытки ретровакцинологии преодолеть неудачи с поисками вакцин против ВИЧ и вируса гриппа через индукцию иммунитета подобранными консервативными ИЭ белков этих вирусов, основанного на образовании Ат с высокой авидностью и широким спектром действия и нейтрализующих многие штаммы соответствующих вирусов [36]. Но нейтрализующие Ат с широким спектром действия специфичны к консервативным фрагментам белков вирусов, которые часто оказываются гомологичными фрагментам белков хозяина и характеризуются недостаточной иммуногенностью [16, 21]. Редкая встречаемость реакции на них ИС объясняется, по-видимому, предсуществующей толерантностью, а образование к ним Ат сопряжено с опасностью возникновения аутоиммунитета. Иммунодоминантные же вирусные эпитопы часто являются высокомультиплетными, не охвачены ИЭКРБ белков человека, а образующиеся к ним Ат не обладают нейтрализующей активностью.

В контексте ИЭКРБ следует осторожно оценивать возможный вклад гуморального и клеточ-

ного ответов АИС в отношении внутриклеточных патогенов различного происхождения. При существовании всеобъемлющего по P_0 и частично по P_{14} ИЭКРБ возникший в умах иммунологов конструкт «свой-несвой» предстает как размытое «понятие» для ИС. Для реакции ИС на Аг, согласно критериям иммуногенности [29], важны его количество, выраженные молекулярные отличия от предсуществовавшего в организме континуума Аг и скорость возникновения новой антигенной модификации. Иными словами, каждый эффекторный ответ ИС обусловлен сильным антигенным нарушением, т.е. внезапным возникновением в организме паттернов Аг, которые сильно отличаются от того континуума Аг, с которым рецепторы клеток ИС непрерывно взаимодействовали ранее. В случае, например, ВИЧ не выполняется ни один из упомянутых критериев: в 70-80% случаев достаточно одного вириона либо инфицированной им клетки, для того чтобы установилась продуктивная клиническая инфекция, т.е. инфекция реализуется при участии предельно минимального количества вирионов, а выраженный ответ пораженной ИС на инфекцию разворачивается, когда вирусом оказывается поражено множество клеток и органов хозяина с формированием практически не устранимого резервуара вируса [34].

Прогнозирование реакции ИС индивидуума на ИЭ патогена осложняется многочисленностью гаплотипов МНС, выявленной в последние годы размытостью путей представления Аг через МНС I и МНС II, а также особенностями иммунопротеасом. Обычно МНС I связывают П (из белков эндогенного происхождения), генерируемые протеасомами, в эндоплазматическом ретикулуме, а МНС II комплексируют с генерированными лизосомным протеолизом П из эндоцитированных либо фагоцитированных белков, т.е. экзогенных Аг. Однако оба МНС имеют доступ к экзогенным и эндогенным Аг, и презентацию МНС I П из экзогенных белков, интернализованных эндоцитозом или фагоцитозом, называют кросс-презентацией [7, 8]. Сам же спектр образованных ИЭ будет определяться составом протеаз в лизосомах и иммунопротеасомах и условиями протекания процесса протеолиза [6, 33]. К тому же, антителогенез запускается координированным узнаванием эпитопа рецепторами В-клеток, которые распознают его трехмерную структуру, и рецепторами хелперных Т-клеток, узнающими линейную структуру эпитопа.

Как проявление следствия существования ИЭКРБ в организме, каждое аутоиммунное заболевание, помимо поражения ИС главной мишени, должно сопровождаться поражением ею в различной степени и других мишеней, иммунно связанных с главной, то есть обязательным

атрибутом аутоиммунных заболеваний должна бы быть коморбидность, что подтверждается их клинической картиной. Эта коморбидность, по-видимому, будет определяться не только нарушением функции белка-мишени ИС и функциональной связностью его с другими белками, но и изменением функций тех белков, которые имеют общие ИЭ с главным белком-мишенью, из-за перекрестных иммунных эффектов. Нельзя не упомянуть, что чувствительность каждого иммунного теста на аутоиммунное заболевание будет варьировать в зависимости от иммунной связности анализируемой им белка-мишени и, в принципе, в аспекте ИЭКРБ 100%-ная специфичность иммунного теста не достижима. Сегодня уже имеются возможности оценивать иммунологические тесты на микропанелях, содержащих до 10000 образцов белков и позволяющих получать близкие к истинным показатели их чувствительности и специфичности.

В последние годы представления о роли ИС в организме существенно усложнились и растет поток сообщений о вовлеченности ее в регуляцию различных физиологических функций. Особенно усилился интерес к вовлеченности в них ЕА. Первоначально исследование ЕА было сосредоточено главным образом на преобладающем среди них IgM и им объяснялись многочисленные эффекты ЕА. Новые данные о IgG и IgA ЕА свидетельствуют о том, что их роль в эффектах ЕА нельзя игнорировать. Тестирование специфичности IgG ЕА на микропанели почти из 10000 белков выявило их взаимодействие с более 1000 белками, зависимость состава IgG ЕА от возраста, пола и имеющегося патологического состояния. Пациенты с болезнью Альцгеймера, болезнью Паркинсона и рассеянным склерозом имели статистически значимое снижение IgA ЕА по сравнению с контрольными лицами того же возраста и пола. Профиль сывороточных IgG аутоантител (ААт) уникален для каждого индивидуума и удивительно стабилен во времени. Количество, разнообразие и явная эволюционная консервативность профиля IgG ААт предполагает существование у них определенной не распознанной функции [25]. Сравнение естественных ААт к миелопероксидазе и ААт к ней при микроскопическом полиангиите показало, что первые содержатся в низких титрах, обладают более низкой авидностью, не содержат фракцию IgG3, слабее ингибируют миелопероксидазу и вызывали значительно меньшую реакцию нейтрофилов. Эти особенности, по-видимому, позволяют непатогенное сосуществование в сыворотке миелопероксидазы с естественными ААт к ней [43]. В отсутствие IgG ААт к миелину нарушается регенерация аксонов после их повреждения [39]. Моноклональные IgM, выделенные из репертуара ЕА и специфичные

к разным компонентам нервной системы, также способствуют регенерации аксонов, что послужило основанием предложить их для терапии рассеянного склероза [32]. Дети с аутизмом имели значительно пониженные уровни IgG и IgM, и это снижение коррелировало со степенью их поведенческих отклонений [17]. ААт к белку теплового шока Hsp-60 являются компонентом ЕА уже у новорожденных детей и являются независимым врожденным фактором риска атеросклероза у взрослых [38]. У здоровых субъектов присутствуют ААт также к протеиназе 3 и базальной мембране почечных гломерул [11]. Мощные иммуномодуляторные эффекты описаны у IgA [32].

Физиологическая роль ААт сегодня уже не нуждается в подтверждении, их многочисленность не вызывает сомнения. Для некоторых из них выявлены ключевые мишени их действия и конкретное участие как в физиологических процессах, отличных от иммунных, так и в патогенезе различных заболеваний, т.е. ЕА являются активными соучастниками глобального регуляторного континуума, под которым можно понимать совокупность всех регуляторных систем организмов, способных реагировать на возникающие внешние и внутренние стимулы. По сравнению с другими регуляторами, как подчеркивается Ашмариным и Фрейдлином в их гипотезе [1], они способны «к долговременной коррекции уровня тех или иных физиологических и биохимических процессов», что обуславливается сроками их существования и пожизненного конститутивного синтеза. В аспекте рассматриваемого концепта ИЭКРБ существование каких других особенностей ЕА как регуляторов можно было бы предположить?

Известные умеренная аффинность ЕА и их многочисленность, с одной стороны, и существование ИЭКРБ и обратимость связывания Ат с Аг, с другой стороны, позволяют, помимо долговременной регуляции, реализовать с участием ЕА и динамичную регуляцию. Последняя может проявляться множеством сценариев, три из которых для простоты рассмотрим на уровне белков. Во-первых, одно и то же ААт может по причине существования ИЭКРБ связываться с разными белками и длительность контакта (динамичность ассоциации и диссоциации) будет определяться аффинностью данного ААт к ИЭ в белке. Само взаимодействие ААт с белком может проявляться не только во включении или выключении функции белка, но и модулировать уровень его активности. Во-вторых, один и тот же белок может содержать несколько разных ИЭ для связывания с разными ААт, каждое из которых может по-разному модулировать функцию белка. Обратимость и последовательность связывания белка с разными ААт будут менять во времени

профиль активности белка, который в значительной степени будет зависеть от концентраций ААт. Если долговременная коррекция состояния физиологического процесса привязана к какому-то одному ААт, то динамичная коррекция будет определяться множественностью имеющихся ААт и составом ИЭ в белке. В-третьих, поскольку между белками и ААт поддерживаются отношения «один ко многим» и «многие к одному», то существование родственных ИЭ в разных белках позволяет одним и тем же ААт вызвать многоуровневые изменения во множестве белков, которое можно рассматривать как динамичную сеть со связностью ее компонентов, определяемой иммунной регуляцией. Выявление и анализ таких сетей представляется еще более трудным, чем анализ антиидиотипических сетей. Очевидно, что концепт динамичной регуляции Ат физиологических функций предполагает существование сложной иммунной сети взаимодействий в организме позвоночных и признание в живых системах таких процессов и явлений, которые в физике уже более 100 лет назад, благодаря вкладу Эйнштейна, воспринимались как находящиеся за пределами человеческого восприятия и жизненного опыта, открытие которых невозможно без предшествующих логических построений, и лишь основанные на них эксперименты способны подтвердить реальность этих процессов.

Завершая обсуждение, нельзя не заметить, что при этой удивительной размытости и стохастичности в функционировании ИС с ее врожденностью иммунного узнавания кажется таинственным, каким образом она проявляет поразительную специфичность на операционном уровне, дарующую большинству из нас защиту в течение долгих лет в этом непрерывно меняющемся мире патогенных микроорганизмов.

В заключение хотелось бы отметить, что современная иммунология располагает возможностями углубиться в анализ одиночной клетки и охарактеризовать сложный состав рецепторов В- или Т-клеток и репертуар Ат, анализировать накопившиеся огромные базы данных, привлекая вычислительные ресурсы для многомерного анализа ИС. Примененный нами компьютерный анализ последовательностей нескольких тысяч белков является примером такого многомерного анализа. Он показал возможность существования глобального ИЭКРБ, на основе которого можно дать новые трактовки различных феноменов ИС и, в частности, рассматривать его как дополнительный фактор, обуславливающий полиреактивность и аутореактивность Ат, и, соответственно, расширить концепцию о регуляторной функции ЕА. В практических медицинских приложениях опора на существование ИЭКРБ была бы особенно полезной в случае поиска вакцин и иммунодиагностик.

Список литературы / References

1. Ашмарин И. П., Фрейдлин И. С. Гипотеза об антителах как новейших регуляторах физиологических функций, созданных эволюцией. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 1989. Т. 25, № 2. С. 176-181. [Ashmarin I.P., Freidlin I.S.. Hypothesis on antibodies as the latest regulators of physiological functions created by evolution. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 1989, Vol. 25, no. 2, pp. 176-181. (In Russ.)]
2. Харченко Е.П. Эволюционные аспекты оценки возможного числа и источников белковых регуляторов в организме. Журнал эволюционной биохимии и физиологии, 1988. Т. 24. С. 240-249. [Kharchenko E.P. Evolutionary aspects of evaluation of possible number and sources of protein regulators in the organism. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimii i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology*, 1989, Vol. 25, no. 2, pp. 240-249. (In Russ.)]
3. Albert M.L., Darnell R.B. Paraneoplastic neurological degenerations: keys to tumor immunity. *Nat. Rev. Cancer*, 2004, Vol. 4, no. 1, pp. 36-44.
4. Avrameas S. Natural autoantibodies: from 'horror autotoxicus' to 'gnosthi seauton'. *Immunol Today*, 1991, Vol. 12, pp. 154-159.
5. Avrameas S., Selmi C. J. Natural autoantibodies in the physiology and pathophysiology of the immune system. *Autoimmun.*, 2013, Vol. 41, pp. 46-49.
6. Basler M., Kirk C. J., Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Current Opinion in Immunology*, 2012, Vol. 25, pp. 1-7.
7. Blum J.S., Wearsch P.A., Cresswell P. Pathways of Antigen Processing. *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 443-473.
8. Chemali M., Radtke K., Desjardins M., English L. Alternative pathways for MHC class I presentation: a new function for autophagy. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, pp. 1533-1541.
9. Cohen I.R., Hershberg U., Solomon S. Antigen-receptor degeneracy and immunological paradigms. *Mol. Immunol.*, 2004, Vol. 40, pp. 993-996.
10. Crozat K., Vivier E., Dalod M. Crosstalk between components of the innate immune system: promoting anti-microbial defenses and avoiding immunopathologies. *Immunological Reviews*, 2009, Vol. 227, pp. 129-149.
11. Cui Z., Zhao M.H., Segelmark M., Hellmark T. Natural autoantibodies to myeloperoxidase, proteinase 3 and the glomerular basement membrane are present in normal individuals. *Kidney Int.*, 2010, Vol. 78, pp. 590-597.
12. Derbinski J., Gäbler J., Brors B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *JEM*, 2005, Vol. 202, no. 1, pp. 33-45.
13. Edelman G.M., Gaily J.A. Degeneracy and complexity in biological systems. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 2001, Vol. 98, pp. 13763-13768.
14. Eisen H.N., Chakraborty A.K. Evolving concepts of specificity in immunereactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, pp. 22373-2277.
15. Esparza J. A brief history of the global effort to develop a preventive HIV vaccine. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, pp. 3502-3518.
16. Haynes B.F., Moody M.A., Alam M., Bonsignori M., Verkoczy L., Ferrari G., Gao F., Tomaras G.D., Liao H.-X., Kelsoe G. Progress in HIV-1 vaccine development. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, pp. 3-10.
17. Heuer L., Ashwood P., Schauer J., Goines P., Krakowiak P., Hertz-Picciotto I., Hansen R., Croen L.A., Pessah I.N., Van de Water J. Reduced levels of immunoglobulin in children with autism correlates with behavioral symptoms. *Autism. Res.*, 2008, Vol. 1, pp. 275-283.
18. Hoffmann J.A., Kafatos F.C., Janeway C.A., Ezekowitz R.A. Phylogenetic perspectives in innate immunity. *Science*, 1999, Vol. 284, pp. 1313-1318.
19. Kang J.Y., Lee Jie-Oh. Structural biology of the Toll-like receptor family. *Annu. Rev. Biochem.*, 2011, Vol. 80, pp. 917-941.
20. Kawai T., Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*, 2011, Vol. 34, pp. 637-650.
21. Klein F., Mouquet H., Dosenovic P., Scheid J., Scharf L., Nussenzweig M.C. Antibodies in HIV-1 Vaccine Development and Therapy. *Science*, 2013, Vol. 341, no. 6151, pp. 1199-1204.
22. Lacroix-Desmazes S., Kaveri S.V., Mouthon L., Ayoub A., Malanchere E., Coutinho A., Kazatchkine M. Selfreactive antibodies (natural autoantibodies) in healthy individuals. *J. Immunol. Methods*, 1998, Vol. 216, pp. 117-137.
23. Madi A., Bransburg-Zabary S., Kenett D.Y., Ben-Jacob E., Cohen I.R. The natural autoantibody repertoire in newborns and adults: a current overview. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2012, Vol. 750, pp. 198-212.
24. Mathis D., Benoist C. Aire. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 287-312.
25. Nagele E.P., Han M., Acharya N.K., DeMarshall C., Kosciuk M.C., Nagele R.G. Natural IgG autoantibodies are abundant and ubiquitous in human sera, and their number is influenced by age, gender, and disease. *PLoS ONE*, 2013, Vol. 8, no. 4, e60726.
26. Notkins A.L. Polyreactivity of antibody molecules. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, pp. 174-179.
27. Paust S., Senman B., von Andrian U.H. Adaptive immune responses mediated by natural killer cells. *Immunological Reviews*, 2010, Vol. 235, pp. 286-296.

28. Plotkin S.A. Correlates of protection induced by vaccination. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, Vol. 17, pp. 1055-1065.
29. Pradeu T., Carosella E.D. On the definition of a criterion of immunogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, pp. 17858-17863.
30. Roberts W.K., Darnell R.B. Neurobiology of the paraneoplastic neurological degenerations. *Cur. Opinion Immunol.*, 2004, Vol. 16, no. 5, pp. 616-622.
31. Rothstein T.L., Griffin D.O., Holodick N.E., Quach T.D., Kaku H. Human B-1 cells take the stage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, (2013), Vol. 1285, pp. 97-114.
32. Schwartz-Albiez R., Monteiro R.C., Rodriguez M., Binder C.J., Shoenfeld Y. Natural antibodies, intravenous immunoglobulin and their role in autoimmunity, cancer and inflammation. *Clinical and Experimental Immunology*, 2009, Vol.158, Suppl. 1, pp. 43-50.
33. Sijts E.J.A.M., Kloetzel P.-M. The role of the proteasome in the generation of MHC class I ligands and immune responses. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2011, Vol. 68, pp. 1491-1502.
34. Smith P.L., Tanner H., Dalgleish A. Developments in HIV-1 immunotherapy and therapeutic vaccination. *F1000Prime Reports*, 2014, Vol. 6, p. 43. doi: 10.12703/P6-43. eCollection 2014
35. Sritesky G. L., Jameson S.C., Hogquist K. A. Selection of self-reactive T cells in the thymus. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, pp. 95-114.
36. Van Regenmortel M. An outdated notion of antibody specificity is one of the major detrimental assumptions of the structure-based reverse vaccinology paradigm, which prevented it from helping to develop an effective HIV-1 vaccine. *Frontiers in Immunology*, 2014, Vol. 5, pp. 1-8.
37. VanRegenmortel M.H.V. Specificity, polyspecificity and heterospecificity of antibody-antigen recognition. *J. Mol. Recognit.*, 2014, Vol. 27, pp. 627-639.
38. Varbiro S., Biro A., Cervenak J., Cervenak L., Singh M., Banhidly F., Sebestyen A., Füst G., Prohászka Z. Human anti-60 kD heat shock protein autoantibodies are characterized by basic features of natural autoantibodies. *Acta Physiologica Hungarica*, 2010, Vol. 97, no. 1, pp. 1-10.
39. Vargas M.E., Watanabe J., Singh S.J., Robinson W.H., Barres B.A. Endogenous antibodies promote rapid myelin clearance and effective axon regeneration after nerve injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, pp. 11993-11998.
40. Vas J., Gronwall C., Silverman G.J. Fundamental roles of the innate-like repertoire of natural antibodies in immune homeostasis. *Frontiers in Immunology*, 2013, Vol. 4, Article 4-2.
41. Vita R., Zarebski L., Greenbaum J.A., Emami H., Hoof I., Salimi N., Damle R., Sette A., Peters B. The Immune epitope database 2.0. *Nucleic Acids Res.*, 2010, Vol. 38. Database issue., D854-D862.
42. Wucherpfennig K.W., Allen P.M., Celada F., Cohen I.R., DeBoer R., Garcia K.C., Goldstein B., Greenspan R., Hafler D., Hodgkin P., Huseby E.S., Krakauer D.C., Nemazee D., Perelson A.S., Pinilla C., Strong R.K., Sercarz E.E. Polyspecificity of Tcell and B cell receptor recognition. *Semin. Immunol.*, 2007, Vol. 19, pp. 216-224.
43. Xu P.-C., Cui Z., Chen M., Hellmark T., Zhao M.-H. Comparison of characteristics of natural autoantibodies against myeloperoxidase and anti-myeloperoxidase autoantibodies from patients with microscopic polyangiitis. *Rheumatology*, 2011, Vol. 50, pp. 1236-1243.

Автор:

Харченко Е.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник,
ФГБУН «Институт эволюционной физиологии
и биохимии им. И.М. Сеченова» РАН, Санкт-Петербург,
Россия

Author:

Kharchenko E.P., PhD, MD (Biology), Leading Research
Associate, I. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and
Biochemistry, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg,
Russian Federation

Поступила 01.03.2015

Отправлена на доработку 15.03.2015

Принята к печати 19.03.2015

Received 01.03.2015

Revision received 15.03.2015

Accepted 19.03.2015

ОБНАРУЖЕНИЕ У ЛЮДЕЙ КРОССРЕАКТИВНЫХ АНТИТЕЛ И Т-КЛЕТОК ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К АНТРОПОНОЗНЫМ И ЗООНОЗНЫМ ПОДТИПАМ ВИРУСА ГРИППА А

Лосев И.В., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А.,
Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г., Найхин А.Н.

ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Существует реальная угроза прорыва в человеческую популяцию зоонозных (птичьих и свиных) вирусов гриппа А. В этом случае тяжесть таких пандемий зависит от состояния иммунитета населения к этим возбудителям. В мировой литературе неоднократно декларировалось положение о полном отсутствии у людей иммунитета к данным возбудителям. Мы исследовали состояние системного, локального и Т-клеточного иммунитета взрослых людей разного возраста к потенциально пандемическим зоонозным (H3N2sw, H5N1, H5N2, H7N3 и H7N9) и антропонозному (H2N2) вирусам гриппа А. Полученные результаты свидетельствуют, что у обследованных лиц существует (i) гетеросубтипический локальный (IgA-АТ) и Т-клеточный (CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетки центральной (T_{cm}) и периферической (T_{em}) иммунологической памяти) иммунитет, но отсутствует системный иммунитет (антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие сывороточные антитела) к птичьим вирусам гриппа А; (ii) локальный иммунитет (IgA-АТ) к циркулировавшему в 1957-1968 гг. антропонозному вирусу А (H2N2) не только у ранее праймированных лиц, но и людей, родившихся после 1968 г; (iii) полноценный системный и локальный иммунитет к потенциально пандемическому свиному вирусу А (H3N2sw). Вывод: для научно обоснованного прогноза эпидемиологической ситуации и планирования объема противоэпидемических мероприятий по потенциально пандемическим вирусам гриппа А необходим периодический мониторинг состояния коллективного иммунитета населения к этим возбудителям по всем его адаптивным параметрам. В этом плане опора только на данные молекулярно-биологического анализа возбудителей может приводить к существенным ошибкам.

Ключевые слова: вирус гриппа, иммунизация, гетеросубтипический иммунный ответ, живая гриппозная вакцина

Адрес для переписки:

Лосев Игорь Владимирович
ФГБУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-42-92.
E-mail: iemlosev@gmail.com

Address for correspondence:

Losev Igor V.
Research Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-42-92.
E-mail: iemlosev@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Лосев, С.А. Дони́на, Г.Д. Петухова, Д.А. Кореньков,
Е.П. Григорьева, Е.М. Дорошенко, Л.Г. Руденко, А.Н. Найхин,
«Обнаружение у людей кроссреактивных антител
и Т-клеток иммунологической памяти к антропонозным
и зоонозным подтипам вируса гриппа А» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 347-358.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-347-358

© Лосев И.В. и соавт., 2015

For citation:

I.V. Losev, S.A. Donina, G.D. Petukhova, D.A. Korenkov,
E.P. Grigorieva, E.M. Doroshenko, L.G. Rudenko, A.N. Naykhin,
“Crossreactive antibodies and memory T cells to human and
zoonotic influenza A viruses in volunteers”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 4,
pp. 347-358. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-347-358

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-347-358>

CROSSREACTIVE ANTIBODIES AND MEMORY T CELLS TO HUMAN AND ZONOTIC INFLUENZA A VIRUSES IN VOLUNTEERS

Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Doroshenko E.M., Rudenko L.G., Naykhin A.N.

Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. There exists a real hazard of transferring zoonotic influenza A viruses, either swine, or avian, into human population. In such case, severity of such pandemics depends on the pathogen-specific immunity in the population. Virtual absence of such immunity in humans was declared in the literature. In this work, we assessed systemic, local, and T-cell immunity to potentially pandemic H3N2sw, H5N1, H5N2, H7N3, H7N9 and H2N2 influenza A viruses in a group of healthy adults of different age. Our results indicate that these subjects develop the following immune reactions: (i) local (i.e., nasal IgA) and cellular (CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells) heterosubtypic immunity, in absence of detectable virus-specific serum antibodies to avian influenza A viruses; (ii) Local immune responses (as nasal IgA) to human A (H2N2) virus which circulated in 1957-1968 were detected both in subjects who could be primed at that time, but also in subjects born after 1968; (iii) full-scale systemic and local immunity to potentially pandemic A (H3N2sw) swine virus was found in the group. Conclusion. In order of proper epidemiological forecasts and planning appropriate preventive measures for potentially pandemic Influenza A viruses, a regular monitoring of collective immunity should be performed using different adaptive markers. In this respect, any conclusion based on molecular analysis only could lead to considerable mistakes, and should be accomplished by the mentioned immunological studies.

Keywords: influenza virus, live vaccine, immunization, heterosubtypic immunity

Введение

На протяжении многих десятилетий проблема гриппа А привлекает пристальное внимание ученых и средств массовой информации. Это связано, с одной стороны, с приобретенным опытом тяжелых последствий для человечества реальных пандемий, с другой — постоянной угрозой прорыва в человеческую популяцию вирусов гриппа А, циркулирующих среди птиц и животных. На сегодняшний день зарегистрировано 18 подтипов вируса гриппа А с гемагглютинидами от H1 до H18 и нейраминидазами от N1 до N11. Все эти подтипы принято делить на антропонозные, то есть циркулирующие среди людей, и зоонозные, поражающие птиц и животных. К первым относятся подтипы А (H1N1), А (H2N2) и А (H3N2), вступающие попеременно в новые пандемические циклы. Зоонозные вирусы могут существовать как в латентном, так и в активном состоянии, периодически вызывая эпизоотии преимущественно среди диких и домашних птиц, а также свиней (птичий и свиные вирусы гриппа А). Однако в двухтысячных годах среди людей были зарегистрированы вспышки гриппа, вызванные птичьими вирусами с гемагглютинином H5, H6, H7 и H9. Особенно тяжелые последствия имели вспышки гриппа А(H5N1) 2003-2005 гг., и А(H7N9) в 2013-2014 гг., когда смертность достигала 30-60% [18, 23]. В 2011 г. отмечено локальное распростра-

нение среди людей свиного гриппа А (swH3N2) [19]. В то же время не было ни одного научно доказанного случая передачи этих зоонозных вирусов от человека к человеку. В 2009 г. приобрел пандемическое распространение вирус гриппа А (H1N1) pdm 2009, имевший генетическое родство со свиными и птичьими вирусами [23]. Все эти события породили вполне закономерную озабоченность научного сообщества, реализовавшуюся в решении Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) о разработке арсенала резервных вакцин против потенциально пандемических зоонозных вирусов гриппа А [22]. В значительной степени это решение базировалось на довольно распространенном мнении о катастрофических последствиях развития ситуации в случае приобретения тем или иным зоонозным вирусом способности к активной трансмиссии среди людей, то есть полной адаптации к человеку. Главным аргументом в пользу возможности быстрой смены хозяина зоонозным вирусом служили бесспорные данные о способности вирусов гриппа А к генетической межтиповой реассортации и к активному эволюционному мутагенезу их РНК-генома. Поэтому основное внимание вирусологов было сосредоточено на исследовании молекулярно-генетических аспектов проблемы, включающих поиск и анализ геномных последовательностей, отвечающих за патогенность и трансмиссивность потенциально пандемических вирусов гриппа А.

При этом состояние популяционного иммунитета — важнейшего звена эпидемического процесса — было изучено значительно слабее, поскольку подразумевалось полное отсутствие у населения иммунной защиты от зоонозных вирусов гриппа А [9, 21]. В настоящем исследовании проанализирован вопрос о правомерности такой точки зрения с позиции формирования у людей гетеросубтипического противогриппозного иммунитета.

Материалы и методы

Волонтеры

Сыворотки крови, секреты верхних дыхательных путей, а также мононуклеары периферической крови (МПК) были отобраны у волонтеров 18–45 лет, участвовавших в 2000–2014 гг. в клинических испытаниях различных гриппозных вакцин (фоновые образцы), а также у лиц 11–85 лет, обследовавшихся в 2011–2012 гг. в различных лабораторных центрах по поводу диагностики соматических заболеваний.

Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)

РТГА воспроизводили по стандартной методике [13]. Сыворотки крови обрабатывали RDE (receptor destroy enzyme). Рабочая доза антигенов составляла 2АЕ, поскольку в предварительных исследованиях было показано ее преимущество перед 4АЕ. Применяли параллельно 1% взвесь человеческих эритроцитов 0(I) группы крови и эритроцитов лошади. Достоверной конверсией титров антител считали его поствакцинальное увеличение в 4 и более раза по отношению к довакцинальному.

Реакция микронеutralизации (PMH)

PMH выполняли стандартным методом [13] на культуре клеток MDCK в концентрации 200 тыс. клеток/мл. Рабочее разведение вируса составляла 100 TCD₅₀/50 мкл. Достоверным считали увеличение титра сывороточных антител в 4 и более раза в поствакцинальный период по отношению к довакцинальному.

Иммуноферментный анализ (ИФА)

IgA- и IgG-антитела в сыворотке крови и IgA-антитела в секретах верхних дыхательных путей выявляли в ИФА по ранее описанной методике [2]. На планшете сорбировали 16АЕ вирусов, очищенных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (30–60%). За титр сывороточных и локальных антител принимали наибольшее разведение исследуемого материала, при котором оптическая плотность (ОП) лунки с образцами превышала среднюю ОП в контрольных лунках (все ингредиенты реакции, не содержащие исследуемый материал) в 2 и более раза. За достоверный прирост титров антител в сыворотке крови и в СВДП принимали его увеличение в 4 и более раза.

Определение вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти

Эти клетки тестировали в проточной цитометрии общепринятым методом внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) после стимуляции клеток *in vitro* 12 MOI очищенного ультрацентрифугированием вакцинного штамма [3]. Мононуклеары периферической крови выделяли стандартным способом на градиенте плотности HISTOPAQUE-1077, отмывали и хранили до проведения анализа в жидком азоте. Для определения спонтанной продукции IFN γ вместо стимуляции вирусом к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640 (отрицательный контроль). В качестве положительного контроля использовали стимуляцию клеток поликлональным стимулятором — стафилококковым энтеротоксином В. После разморозки порции клеток волонтеров, отобранные во всех временных интервалах, были способны к активации продукции IFN γ . При анализе данных показатели отрицательного контроля вычитались из аналогичных показателей, полученных для вирусстимулированных клеток. Показатели всех контролей были адекватны. В проточной цитометрии маркерами Т-лимфоцитов центральной (T_{cm}) и периферической (T_{em}) иммунологической памяти CD4⁺ и CD8⁺ клеток служили меченные флюорохромом мононуклеарные антитела к, соответственно, CCR7⁺CD45RA⁻ и CDR7⁻CD45RA⁻ (Beckman Coulter, Becton Dickinson). Достоверным увеличением уровня клеток у привитых считали 3 стандартных отклонения от уровня тех же клеток у лиц контрольной группы, получавших препарат плацебо.

Антигены

В РТГА, PMH и ИФА использовали приготовленные в отделе вирусологии НИИЭМ апа-тогенные вакцинные штаммы вирусов А/17/Калифорния/2009/38(H1N1) — в международной классификации А(H1N1)pdm 2009; А/17/индюк/Турция/05/133 (H5N2) — авторы И.В. Киселева и Н.В. Ларионова; А/17/утка/Потсдам/86/92 (H5N2); А/17/дикая утка/Нидерланды/00/95(H7N3) — автор Ю.А. Дешева; А/17/Ануи/2013/61(H7N9) — автор И.Н. Искова-Сивак. Штамм NIBRG-23 — (А/индюк/Турция/1/2005*PR/8) получен из ВОЗ.

Статистическая обработка результатов

Использовали программное обеспечение Statistica и Graph Pod Prizm 5. Для сравнения данных применяли Wilcoxon Mathed Paire Test, Friaman ANOVA и Fisher exact (two-tailed).

Результаты

В таблице 1 представлены данные об обнаружении у взрослых людей сывороточных и локаль-

ных IgA-антител к различным птичьим вирусам гриппа А и к вирусу А (H1N1) pdm 2009 перед началом его циркуляции в 2009 году. Обращают на себя внимание два момента. Во-первых, средний геометрический титр (СГТ) сывороточных и локальных IgA-антител к вирусу А (H1N1) pdm 2009 в предэпидемический период оказался намного выше, чем СГТ антител к птичьим вирусам. Аналогичная закономерность наблюдалась и в отношении сывороточных антигемагглютинирующих антител. Во-вторых, СГТ всех типов антител (за исключением антигемагглютинирующих) к вирусам А (H5N1) и А (H5N2) были выше, чем к вирусам А (H7N3) и А (H7N9).

Таблица 2 отражает результаты выявления сывороточных и локальных IgA-антител к птичьим вирусам гриппа А (H5N1) и А (H7N3) у людей разного возраста от 18 до 84 лет. Данные приведены по двум показателям: СГТ антител и число (%) лиц со значимыми и защитными титрами антител.

Сывороточные антигемагглютинирующие антитела к этим вирусам во всех возрастных группах не были обнаружены. По данным о СГТ локальных антител в СВДП и слюне наблюдалась тенденция к их возрастному увеличению. При этом по всем показателям отмечались четкие отличия у людей, родившихся до и после 1969 г., то есть, соответственно, 1947-1957 и 1969-1995 гг. рождения. У части лиц, родившихся как до, так и после 1969 г., фиксировались защитные титры локальных антител к вирусам гриппа А (H5N2) и А (H7N3), но у первых показатели были выше.

Таким образом, данные таблицы 2 свидетельствуют, что сывороточные антигемагглютинирующие антитела к птичьим вирусам гриппа А (H5N2) и А (H7N3) отсутствовали у всех лиц, независимо от их возраста. Однако у тех же людей выявлялись локальные антитела к этим вирусам, причем у родившихся до 1969 г. в больших концентрациях, чем у родившихся после 1969 г. Обращает на себя внимание то, что первые были праймированы вирусом А (H2N2) в 1957-1968 гг., а вторые не встречались по возрасту с этим возбудителем.

Таблица 3 включает данные о присутствии сывороточных и локальных антител к другому потенциально пандемическому антропонозному вирусу — А (H2N2). Количественные показатели этих антител оценивали у лиц, праймированных и непраймированных этим вирусом (соответственно, родившихся до 1967 г. и после 1968 г.).

Сывороточные антигемагглютинирующие антитела выявлялись только у праймированных людей и в весьма высоких титрах. Локальные антитела определялись и у тех, и у других, но у праймированных — в более высоких концентрациях.

Таблица 4 дает представление о состоянии системного гуморального иммунитета (сывороточные антитела по данным РТГА) к потенциально пандемическому свиному вирусу А (swH3N2) у людей разного возраста от 11 до 85 лет. Параллельно у них тестировали эти антитела к человеческому актуальному вирусу того же подтипа.

Повозрастной профиль серограммы по всем количественным данным об антителах к обоим вирусам был очень сходным и отражал поражаемость разных возрастных контингентов актуальным вирусом гриппа А (H3N2) в эпидемический сезон. При этом у значительной части лиц активного возраста были выявлены антитела к свиному вирусу даже и в защитных титрах.

В таблице 5 приведены сравнительные данные, отражающие постэпидемические изменения СГТ локальных антител к пяти вирусам гриппа А: циркулирующим А (H1N1) и А (H3N2), к потенциально пандемическому человеческому А (H2N2) и к птичьим А (H5N2) и А (H7N3).

Наибольшая кратность прироста СГТ в постэпидемический период по отношению к предэпидемическому отмечалась к этиологическому агенту эпидемии, то есть вирусу А (H1N1) — 5,4. В то же время кратность повышения СГТ антител к нециркулирующим вирусам А (H2N2), А (H5N2) и А (H7N3) была довольно высокой — от 1,8 до 2,4.

Данные рисунка 1 отражают обнаружение у обследованных взрослых людей 18-45 лет вирусспецифических CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти к неактуальному человеческому вирусу А (H2N2), и к птичьим вирусам А (H5N1), А (H5N2) и А (H7N3), а также к вирусу А (H1N1) pdm 2009 до его вступления в эпидемическую циркуляцию. Эти данные свидетельствуют, во-первых, о наличии у части лиц этих клеток, во-вторых, о значительных индивидуальных отличиях в их количественных показателях.

Обсуждение

Долговременная иммунологическая память к вирусам гриппа А является главным компонентом адаптивного иммунитета к этим возбудителям. Она формируется двумя путями. Первый путь — праймирование людей актуальными циркулирующими вирусами гриппа А при инфицировании или вакцинации. При этом иммунологическая память образуется не только непосредственно к праймирующему вирусу определенного подтипа (гомологичный иммунитет), но и к вирусам других подтипов за счет синтеза клеток памяти к консервативным иммунодоминантным эпитопам наружных и, особенно, внутренних белковых структур вириона (прямой гетеросубтипический иммунитет) [4].

Вирусы гриппа А	Обратная величина средних геометрических титров антител**			
	РТГА (сыв. крови)	РМН (сыв. крови)	ИФА-IgA (сыв. крови)	ИФА-IgA (СВДП)****
H1N1pdm2009*	7,1 ¹	HI***	99,6 ³	71,1 ⁷
H5N1	2,5 ²	5,5 ³	27,6 ⁴	7,1 ⁸
H5N2 утка	3,4	5,3 ³	31,5 ⁴	9,7 ⁸
H5N2 индюк	2,6 ²	5,3 ³	25,4 ^{4,5}	6,6 ⁸
H7N3	2,7 ²	4,5	18,4 ⁴	3,2 ⁸
H7N9	2,6 ²	3,0 ⁴	11,4 ^{4,6}	2,9 ⁸

ТАБЛИЦА 2. ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ К ПТИЧИМ ВИРУСАМ ГРИППА А H5N2 И H7N3 У ВЗРОСЛЫХ ЛЮДЕЙ РАЗНОГО ВОЗРАСТА

Годы рожд.	Возраст (лет)	Число лиц	Антитела к вирусам гриппа											
			А (H5N2) индюк					А (H7N3)						
			РТГА		ИФА-IgA в СВДП***		ИФА-IgA в слюне		РТГА		ИФА-IgA в СВДП***		ИФА-IgA в слюне	
			СТГ*	≥ 1:40**	СТГ*	≥ 1:64**	СТГ*	≥ 1:16**	СТГ	≥ 1:40**	СТГ*	≥ 1:64**	СТГ*	≥ 1:16**
1989-1995	18-24	26	2,5	0	3,0 ¹	0	3,6	0	2,5	0	3,3	0	7,1	2 (8%)
1979-1988	25-34	18	2,6	0	4,2 ¹	0	4,8	2 (11%)	2,5	0	3,2	0	6,7	1 (6%)
1969-1978	35-44	24	2,6	0	3,2 ¹	0	2,6	1 (4%)	2,5	0	3,2	0	8,0	9 (38%)
1947-1956	57-66	26	2,5	0	14,2 ²	4 (15%)	11,3	13 (50%)	2,5	0	5,6	3 (12%)	9,1	12 (46%)
1937-1946	67-76	24	2,5	0	25,7	8 (33%)	17,4	17 (71%)	2,5	0	6,8	1 (4%)	11,6	16 (67%)
1927-1936	77-84	21	2,5	0	11,3	4 (19%)	13,1	12 (46%)	2,5	0	5,2	1 (5%)	14,6	13 (62%)

351

ТАБЛИЦА 3. ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИТЕЛ К ВИРУСУ ГРИППА А (H2N2) У ЛЮДЕЙ, РАНЕЕ ПРАЙМИРОВАННЫХ ЭТИМ ВИРУСОМ В 1957-1968 гг. И НЕ ВСТРЕЧАВШИХСЯ С НИМ

Годы рождения	Число лиц	Антитела									
		Сывороточные (РТГА)					Локальные IgA в СВДП* ИФА				
		СТГ**	Титры		СТГ**	Титры			СТГ**	Титры	
			≤ 1:10	≥ 1:20	≥ 1:40	≤ 1:16	≥ 1:32	≥ 1:64		≤ 1:4	≥ 1:8
До 1968	38	21,1	12 (32%)	26 (68%)	10 (26%)	7,7	28 (74%)	10 (26%)	6 (16%)	16 (42%)	22 (58%)
После 1968	40	2,8	0	0	0	2,8	37 (93%)	3 (8%)	1 (3%)	26 (65%)	14 (35%)

Примечание. * – секреты верхних дыхательных путей. ** – средние геометрические титры антител.

ТАБЛИЦА 4. ОБНАРУЖЕНИЕ У ЛЮДЕЙ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ АНТИТЕЛ К СВИНОМУ И ЧЕЛОВЕЧЕСКОМУ ВИРУСАМ ГРИППА А (H3N2)

Годы рождения	Возраст (лет)	Число лиц	Титры антител по данным РТГА*									
			Свиной А/Индиана/10/2011 (swH3N2)					Человеческий А/17/Перт/ 87 (H3N2)				
			СТГ**	Титры		СТГ**	Титры			СТГ**	Титры	
				≥ 1:20	≥ 1:40		≥ 1:20	≥ 1:40	≥ 1:80		≥ 1:20	≥ 1:40
1991-2000	11-20	30	13,8	12 (40%)	8 (26,7%)	21,4 ⁷	29 (96,8%) ⁹	10 (33,3%) ¹¹				
1981- 1990	21-30	30	33,2 ¹	24 (80%) ³	16 (53,3%) ⁵	30,1 ⁷	14 (46,7%)	9 (30,0%) ¹¹				
1951-1960	51-60	30	9,3 ²	6 (20%) ⁴	3 (10%)	10,5 ⁸	11 (36,7%) ¹⁰	4 (13,3%)				
1041-1950	61-70	30	9,1 ²	7 (35%) ^{-123,3}	1 (3,3%) ⁶	12,0	9 (30,0%) ¹⁰	5 (16,7%)				
1926-1940	71-85	37	8,6 ²	7 (18,9%) ⁴	3 (8,1%) ⁶	9,5 ⁸	2 (5,4%) ¹⁰	2 (5,4%) ¹²				

Примечание. * – сыворотки крови отобраны в апреле-мае 2011 г. ** – обратные величины средних геометрических титров антител. *** – цифры 1-12 означают наличие статистически значимых отличий между показателями: 1-2 p < 0,01; 3-4 p < 0,01 или 0,001; 5-6 p < 0,01; 7-8 p < 0,05; 9-10 p < 0,05 или 0,01; 11-12 p < 0,05.

ТАБЛИЦА 5. ОБНАРУЖЕНИЕ ЛОКАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ У ЛЮДЕЙ 18-50 ЛЕТ К РАЗЛИЧНЫМ СЕРОПОДТИПАМ ВИРУСА ГРИППА А В ДО- И ПОСТ- ЭПИДЕМИЧЕСКИЙ СЕЗОН 2012-2015 гг.

Число лиц	Время отбора СВДП	Средние геометрические титры (СТГ) локальных IgA-антител в СВДП*			
		A (H1N1)pdm2009	A (H3N2)	A (H2N2)	A (H7N3)
71	Октябрь 2012	12,9	9,9	8,4	9,0
	Апрель 2013	69,7 5,4**	19,7 2,0**	17,8 2,1**	16,2 1,8**

Примечание. * – секреты верхних дыхательных путей. ** – кратность прироста СТГ антител в пандемический период (апрель 2013 г.) по отношению к доэпидемическому периоду (октябрь 2012 г.).

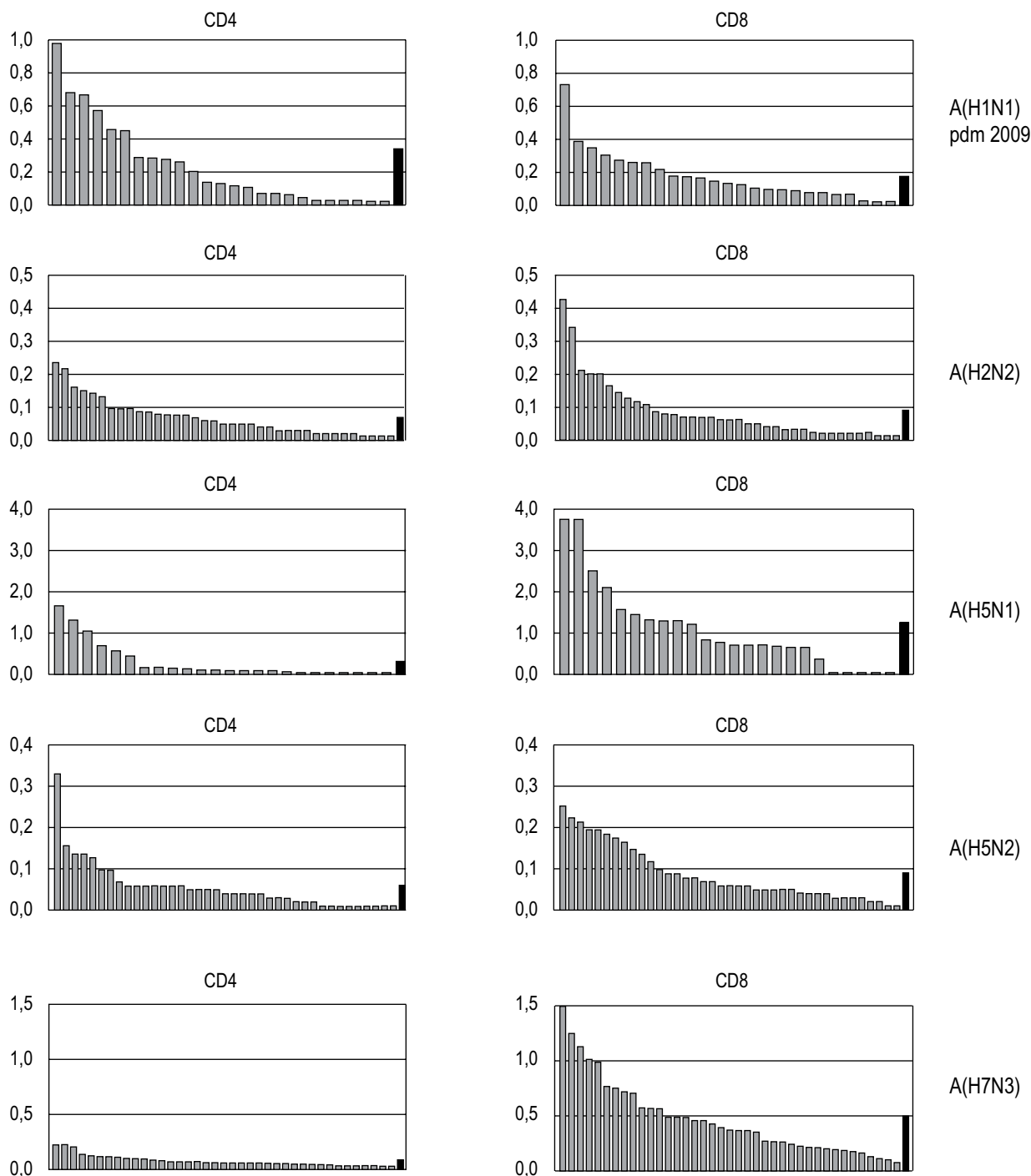


Рисунок 1. Обнаружение у взрослых людей 18-45 лет CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток к человеческим и птичьим вирусам гриппа А

Второй путь — ретроспективное праймирование населения выбывшими из циркуляции подтипами вируса гриппа А (анамнестический гетеросубтипический иммунитет). На сегодняшний день — это вирус А (H2N2), циркулировавший в 1957-1968 гг., а в 1977 вирус А (H1N1), рециркулировавший после двадцатилетнего перерыва. Прямой и анамнестический гетеротипический

иммунитет, носителями которого являются кросс-реактивные В- и Т-клетки иммунологической памяти, служат действенными механизмами регуляции эпидемического процесса. Так, первый повышает клиренс возбудителя и снижает тяжесть гриппозной инфекции при инфицировании людей новыми дрейфовыми или шифтовыми вариантами вируса гриппа А [4], второй — защи-

щает от заболевания при рециркуляции старых подтипов этого возбудителя, как это наблюдалось в 1977 г. при возвращении в циркуляцию вируса A(H1N1). О присутствии у людей кроссреактивной В- и Т-клеточной памяти к конкретному подтипу вируса гриппа А можно судить по обнаружению вирусспецифических антител и Т-клеток памяти фенотипов CD4⁺ (Т-хелперы) и CD8⁺ (цитотоксические лимфоциты).

В настоящей работе было изучено состояние иммунитета у людей к вирусу A(H1N1)pdm 2009, начавшему пандемическое распространение в эпидемический сезон 2009 г. В начале пандемии превалировало мнение о том, что его глобальное распространение приведет к катастрофическим последствиям для человечества, поскольку этот вирус представлял собой реассортант между свиным, птичьим и человеческим вирусами гриппа А (H1N1) [20]. Кроме того, считалось, что у подавляющей части населения, за исключением лиц пожилого возраста, иммунитет к этому возбудителю отсутствует, так как у них не выявлялись сывороточные антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела [21]. Однако, этот прогноз не оправдался, поскольку пандемия носила весьма умеренный характер [12]. Естественно, возник вопрос о причине такой умеренности.

Наши результаты показали, что перед вступлением в циркуляцию вируса А (H1N1)pdm 2009 у взрослых людей действительно не обнаруживались антитела данного типа, но выявлялись в значительных концентрациях перекрестнореагирующие локальные IgA — антитела и вирусспецифические CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки иммунологической памяти. Безусловно, что те и другие индуцировались при контактах с предшествующими актуальными вирусами А (H1N1). Вполне вероятно, что наличие у населения хорошо выраженного локального и Т-клеточного иммунитета снижало интенсивность эпидемического процесса при гриппе А (H1N1)pdm 2009.

Вирус гриппа А (H2N2) считается наиболее вероятным претендентом на новый рециркуляционный цикл [11]. Нами изучено состояние гуморального иммунитета к этому вирусу в двух группах людей: встречавшихся с ним в 1957-1968 гг. и родившихся после 1068 г., то есть у непраймированных лиц.

Сывороточные антигемагглютинирующие антитела к вирусу А (H2N2) у праймированных лиц фиксировались в довольно высоких титрах, а у непраймированных они отсутствовали. Эти данные подтверждают сохранение хорошо выраженной системной В-клеточной иммунологической памяти к данному возбудителю у людей, встречавшихся с ним ранее. В отличие от антигемагглютинирующих, локальные IgA-антитела

выявлялись и у праймированных и у непраймированных людей, но у первых их уровень был выше, чем у вторых. Это свидетельствует, что существует не только долговременная системная, но и долговременная локальная В-клеточная иммунологическая память. По сравнению с системной памятью ее некоторая стертость проявления объясняется за счет фиксации в ИФА у непраймированных лиц кроссреактивных IgA — антител к общим антигенным структурам вируса гриппа А. Ранее существование долговременной локальной В-клеточной памяти относили к неизученной проблеме [7].

В 2011 г. появились сообщения о локальных заболеваниях людей свинным вирусом А/Индиана/10/2011(swH3N2) с инкорпорированным геном матриксного белка от вируса А (H1N1)pdm2009 [8]. В связи с этим настораживающим фактором даже возник вопрос о создании специальной вакцины против этого вируса [14]. Проведенные исследования (табл. 4) показали, что повозрастной профиль уровня выявленных сывороточных антигемагглютинирующих антител к человеческому и данному свиному вирусам гриппа А (H3N2) почти полностью совпадает. Это свидетельствует о том, что иммунная система людей практически не отличает оба вируса, то есть при встрече человека с актуальным вирусом гриппа А (H3N2) В-клетки секретируют антитела не только против праймирующего человеческого, но и свиного варианта этого вируса. Учитывая факт длительной циркуляции вирусов гриппа А(H3N2) и, как следствие, формирование к нему мощной иммунологической памяти у населения, зоонозные вирусы с аналогичными антигенными формулами не имеют шанса вызвать тяжелые пандемии. Это подтвердилось в отношении «свиного» вируса А(H1N1)pdm2009. Об этом же свидетельствуют наши и зарубежные [14] данные об обнаружении антител к свиному вирусу А (swH3N2).

Нами проанализирован вопрос о гетеросубтипическом локальном иммунитете к потенциально-пандемическим птичьим вирусом с гемагглютиниринами H5 и H7. При этом одна группа вирусов имела нейраминидазу, общую с циркулирующими подтипами вируса гриппа А (N1 и N2), а у другой это сходство отсутствовало (N3 и N9).

У взрослых людей были выявлены кроссреактивные локальные IgA-антитела ко всем изученным птичьим вирусам, а у части даже в защитных титрах (табл. 1 и 2). При этом сывороточные антигемагглютинирующие и вируснейтрализующие антитела отсутствовали, что подтверждает данные других авторов [9, 16]. В отношении локальных IgA антител к птичьим вирусам обращает на себя внимание три момента. Во-первых,

сам факт их обнаружения, во-вторых, их уровень был намного ниже уровня этих антител к вирусу A(H1N1)pdm2009 в предвакцинальный период времени, в-третьих, СГТ данных антител к птичьим вирусам с общими с циркулирующим вирусом нейраминидазами N1 и N2 превосходили по значению аналогичные показатели к вирусам с отличающимися нейраминидазами N3 и N9. Последнее обстоятельство подчеркивает индивидуальный вклад нейраминидазы в индукцию локальных антител к потенциально пандемическим птичьим вирусам гриппа А.

Возраст людей является одним из главных фенотипических признаков, влияющих на формирование противогриппозного иммунитета. Ранее нами показано существование прямой зависимости между возрастом и напряженностью локального иммунитета к дрейфовым вариантам вируса гриппа A(H1N1) и A(H3N2) [1]. Этот вопрос в отношении птичьих вирусов оставался открытым.

Наши данные (табл. 2) об обнаружении локальных IgA-антител к вирусам A(H5N1) и A(H7N3) среди людей разного возраста от 18 до 84 лет показали наличие точно такой же зависимости, то есть с увеличением возраста возрастали и СГТ локальных антител. Однако привлекает внимание другой момент — довольно резкое отличие в обнаружении в СВДП IgA-антител у лиц, родившихся до и после 1968 г., то есть у праймированных и не праймированных вирусом A(H2N2). Так, у вторых их уровень был минимальным, а у первых оказался значительно выше. В большей степени это относилось к антителам к вирусу A(H5N2), чем к A(H7N3). Данное обстоятельство можно объяснить только с точки зрения существования праймирующего эффекта вируса A(H2N2) на секрецию локальных антител к птичьим вирусам. Сравнительно недавно показано присутствие общих иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов в составе гемагглютининов H5 и H2, запускающих продукцию вирусспецифических CD4⁺Т-клеток [8, 17]. Известно, что эти клетки регулируют локальный гуморальный иммунный ответ [7].

Нами изучено состояние локального иммунитета у взрослых людей до и после эпидемии гриппа A(H1N1) 2012-2013 гг. (табл. 5). Полученные данные однозначно свидетельствуют о том, что эпидемия гриппа сопровождалась повышением у обследованных лиц не только уровня локальных IgA-антител к ее возбудителю, то есть к вирусу гриппа A(H1N1), но и к нециркулирующим вирусам A(H2N2), A(H5N2) и A(H7N3). Эти данные весьма важны для представления о механизме формирования гетеросубтипического локального гуморального иммунитета в есте-

ственных условиях эпидемического процесса при гриппе А.

В дополнение к данным о гуморальном иммунитете нами проведено количественное определение у взрослых людей 18-53 лет циркулирующих в крови CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток долговременной иммунологической памяти к вирусу A(H1N1)pdm2009 до его эпидемического распространения, а также к нециркулирующим вирусам A(H2N2), A(H5N1), A(H5N2) и A(H7N3) — рисунок 1. Полученные данные четко свидетельствуют о наличии у части обследованных волонтеров этих клеток, специфических ко всем перечисленным вирусам. Такие кроссреактивные клетки стимулируются при контактах с актуальными вирусами A(H1N1) и A(H3N2) за счет наличия консервативных иммунодоминантных Т-клеточных эпитопов в структуре гемагглютинаина, нейраминидазы, матриксного белка и нуклеопротеина у всех подтипов вируса гриппа А [4, 8]. Ранее нами показана способность живых гриппозных моновакцин A(H1N1)pdm2009, A(H5N2) и A(H7N3) стимулировать продукцию перекрестнореагирующих локальных антител и Т-клеток иммунологической памяти внутри этих подтипов вируса гриппа А [3, 5, 6].

Обобщая представленные материалы, можно отметить следующее:

Впервые проведено комплексное исследование состояния у взрослых людей системного гуморального, локального гуморального и Т-клеточного иммунитета к потенциально пандемическим антропонозным и птичьим вирусам гриппа А. Собственные и литературные данные по этому вопросу позволяют сделать ряд выводов, а именно:

У взрослых людей отсутствует системный гуморальный иммунитет ко всем перечисленным вирусам, опосредованный сывороточными антигемагглютинирующими и вируснейтрализующими антителами. Однако у этих людей обнаруживаются такие составляющие гетеросубтипической иммунной защиты, как кроссреактивные локальные IgA антитела (локальная В-клеточная память) и кроссреактивные CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки, специфические к этим вирусам (Т-клеточная память). Продукция этих антител и Т-клеток поддерживается за счет контактов с актуальными подтипами вируса гриппа А. Индукторами данных антител и клеток являются консервативные участки белков вириона, имеющиеся у всех подтипов вируса гриппа А вне зависимости от их хозяина. Активность стимуляции кроссреактивных локальных IgA-антител зависит от трех факторов: от возраста людей (прямая зависимость), от анамнестического праймирования организма выбывшим из циркуляции потенциально пандемическим

подтипом вируса (например, А (H2N2)) и от соответствия антигенной формулы потенциально пандемического и актуального вируса. Наиболее интенсивно кроссреактивные локальные IgA-антитела против потенциально пандемических вирусов гриппа А продуцируются при полном совпадении их антигенной формулы с циркулирующими подтипами (вирус А (H1N1)pdm2009), менее интенсивно — при отличии по гемагглютинирующей и совпадении по нейраминидазе (вирусы А (H5N1), А (H5N2)) и с наименьшей интенсивностью — при полном отличии антигенных формул (вирусы А (H7N3), А (H7N9)).

И, наконец, о самом главном вопросе, требующем отдельного обсуждения — существует ли естественно приобретенная иммунная защита людей от потенциально пандемических зоонозных вирусов гриппа А в случае полного преодоления ими межвидового барьера с беспрепятственной передачей от человека к человеку? Абсолютно точно ответить на этот вопрос можно только при развертывании реальных событий. Но, на наш взгляд, существуют три важных момента, которые склоняют в пользу утвердительного ответа.

Во-первых, на примере пандемии гриппа А (H2N2) 1957-1968 доказано, что люди с высоким уровнем сывороточных антител к предшествующему варианту, то есть к вирусу А (H1N1), были защищены значительно лучше, чем лица, у которых эти антитела отсутствовали, либо их титр был низким [15]. В данном случае сывороточные антитела являлись не столько прямыми протекторами, сколько маркерами общего состояния гетеросубтипического иммунитета, в том числе опосредованного кроссреактивными локальными антителами и вирусспецифическими Т-клетками. Но в то время, естественно, исследования этих факторов иммунитета не могли проводиться. По аналогии с высокой долей вероятности можно предположить, что данный феномен может иметь место при пандемическом распространении любых новых сероподтипов вируса гриппа А, в том числе и зоонозных с полностью отличающейся антигенной формулой. В этом случае наличие перекрестнореагирующих В- и Т-клеток может служить фактором, смягчающим тяжесть пандемии.

Во-вторых, пандемическое распространение «свиного» вируса гриппа А (H1N1) в 2009 г. отнюдь не сопровождалось предсказываемыми катастрофическими последствиями. В этом случае относительная мягкость пандемии была связана с наличием у большинства населения иммунитета, приобретенного вследствие длительной циркуляции предшествующих штаммов данного подтипа вируса [6]. Это показано нами на примере состояния локального и Т-клеточного имму-

нитета у взрослых людей перед началом его эпидемического распространения (табл. 1, рис. 1). Также по аналогии можно предсказать, что при «прорыве» в человеческую популяцию зоонозного вируса гриппа А с антигенной формулой, полностью совпадающей с циркулирующим вирусом, не следует ожидать тяжелой пандемии.

В-третьих, обнаруженные нами кроссреактивные локальные антитела и вирусспецифические Т-клетки к птичьим подтипам вируса гриппа А должны снижать тяжесть эпидемического процесса, если эти вирусы начнут глобальное распространение среди людей. В большей степени это касается птичьих вирусов с общей с циркулирующим вирусом нейраминидазой.

Таким образом, по нашему глубокому убеждению, гетеросубтипический локальный гуморальный и Т-клеточный противогриппозный иммунитет является мощным природным фактором защиты человеческой популяции при внедрении в нее любых новых шифтовых вариантов вируса гриппа А, включающих все известные подтипы, в том числе и зоонозные. Однако он не столь совершенен, как гомологичный иммунитет, так как его воздействие ограничивается клиренсом вируса и смягчением инфекционного процесса [4]. Но и в этом случае его роль велика, поскольку при полном его отсутствии заражение людей сопровождалось бы очень высокой летальностью и даже почти поголовным вымиранием, как это наблюдалось в 16-19 веках при заносах гриппа в длительно изолированные коллективы аборигенов Латинской Америки и отдаленных островов. Сказанное ни в коей мере не отрицает значения вакцинопрофилактики населения против потенциально пандемических вирусов гриппа А. Безусловно, такие резервные вакцины нужны, поскольку они индуцируют у людей более совершенный тип иммунитета — гомологичный штаммоспецифический. Знания о закономерностях естественно приобретенного гетеросубтипического иммунитета к этим возбудителям и периодический мониторинг данного процесса нужны для прогнозирования особенностей развития эпидемического процесса, а, следовательно, и объема профилактических мероприятий среди разных возрастных групп населения в случае возникновения угрожающей ситуации. Кроме того, в этом случае данные о постинфекционной и поствакцинальной индукции гетеросубтипического иммунитета разными подтипами вируса гриппа А могут ориентировать в оптимальном выборе уже имеющихся сезонных и резервных вакцин для экстренной профилактики гриппа в зависимости от антигенной формулы нового пандемического варианта [3, 5, 6, 10].

Список литературы / References

1. Баранцева И.Б., Найхин А.Н., Дони́на С.А., Степанова Л.А., Рекстин А.Р., Григорьева Е.П., Дешева Ю.А., Руденко Л.Г. Гуморальный и местный иммунный ответ на гриппозные вакцины у лиц пожилого и молодого возраста // Вопросы вирусологии, 2003. Т. 48, № 2. С. 32-36. [Barantseva I.B., Naikhin A.N., Donina S.A., Stepanova L.A., Rekstin A.R., Grigoryeva E.P., Desheva Yu.A., Rudenko L.G. The humoral and local immune response to influenza vaccine in the elderly and young. *Voprosy Virusologii = Problems in Virology*, 2003, Vol. 48, no. 2, pp. 32-36. (In Russ.)]
2. Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Кузнецова С.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Локальный и гуморальный иммунный ответ у больных гриппом и у лиц, привитых против сезонных и пандемических вирусов гриппа А // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 3. С. 37-42. [Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Kuznetsova S.A., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Local Antibody Immune Responses in Influenza Patients and Persons Vaccinated with Seasonal, Pre-pandemic, and Pandemic Live Attenuated Influenza Vaccines. *Voprosy Virusologii = Problems in Virology*, 2013, Vol. 58, no. 3, pp. 37-42. (In Russ.)]
3. Найхин А.Н., Чиркова Т.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Дони́на С.А., Руденко Л.Г. Стимуляция гомо- и гетерологичной Т-клеточной иммунологической памяти у волонтеров, привитых живой реассортантной гриппозной вакциной типа А(Н5N2) // Вопросы вирусологии, 2012. Т. 57, № 1. С. 38-42. [Naikhin A.N., Chirkova T.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Rudenko L.G. Stimulation of homo- and heterologic T-cell immunological memory in volunteers inoculated with live influenza A (H5N2) reassortant vaccine. *Voprosy Virusologii = Problems in Virology*, 2012, Vol. 57, no. 1, pp. 38-42. (In Russ.)]
4. Найхин А.Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация // Вопросы вирусологии, 2012. Т. 57, № 3. С. 4-9. [Naikhin A.N. Heterosubtypic immunity to influenza A viruses: epidemiological data, involvement of different immunological factors, vaccination. *Voprosy Virusologii = Problems in Virology*, 2012, Vol. 57, no. 3, pp. 4-9. (In Russ.)]
5. Найхин А.Н., Дони́на С.А., Лосев И.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Коншина О.С., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Гомологичный и гетерологичный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ людей на живые реассортантные гриппозные вакцины А(Н5N2) и А(Н7N3) // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 59-70. [Naykhin A.N., Donina S.A., Losev I.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Stukova M.A., Erofeeva M.K., Konshina O.S., Smolonogina T.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Rudenko L.G. Homological and heterological antibody and T-cell immune responses to live attenuated influenza vaccine A (H5N2) and A (H7N3). *Meditinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 59-70. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-59-70 (In Russ.)]
6. Найхин А.Н., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Суворова М.А., Руденко Л.Г. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у людей к вирусу гриппа А/Калифорния/07/2009(Н1N1)pdm2009 // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 2. С. 38-42. [Naikhin A.N., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Suvorova M.A., Rudenko L.G. Humoral and Cell-mediated Immune Responses in Humans to the A/California/ 07/ 2009 (H1N1) Virus, A(H1N1)pdm2009. *Voprosy Virusologii = Problems in Virology*, 2013, Vol. 58, no. 2, pp. 38-42. (In Russ.)]
7. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: Гэотар-Медиа, 2010. 749 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: Geotar-Media, 2010. 749 p.
8. Babon J.A., Cruz J., Ennis F.A., Yin L., Terajima M. A human CD4⁺ T cell epitope in the influenza hemagglutinin is cross-reactive to influenza A virus subtypes and to influenza B virus. *J. Virol.*, 2012, Vol. 86, no. 17, pp. 9233-9243.
9. Broberg Eeva, Angus Nicoll, and Andrew Amato-Gauci Virus - Where Are We? Seroprevalence to Influenza A(H1N1) 2009. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, Vol. 18, no. 8, p. 1205.
10. Chirkova T.V., Naykhin A.N., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Donina S.A., Mironov A.N., Rudenko L.G. Memory T-cell immune response in healthy young adults vaccinated with live attenuated influenza A (H5N2) vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2011, Vol. 18, no. 10, pp. 1710-1718.
11. Dowdle W. Influenza A virus recycling revisited. *Bull World Health Organ.*, 1999, Vol. 77, no. 10, pp. 820-828.
12. Maritz J., Maree L., Preiser W. Pandemic influenza A (H1N1) 2009: the experience of the first six months. *Clin. Chem. Lab Med.*, 2010, Vol. 48, no. 1, pp. 11-21.
13. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, Vol. 37, pp. 937-943.
14. Skowronski D.M., De Serres G., Janjua N.Z., Gardy J.L., Gilca V., Dionne M., Hamelin M.E., Rhéaume C., Boivin G. Cross-reactive antibody to swine influenza A(H3N2) subtype virus in children and adults before and after immunisation with 2010/11 trivalent inactivated influenza vaccine in Canada, August to November 2010. *Euro Surveill.*, 2012, Vol. 17, no. 4.
15. Slepishkin A. N.. The effect of a previous attack of A1 influenza on susceptibility to A2 virus during the 1957 outbreak. *Bull World Health Organ.*, 1959, Vol. 20, no. 2-3, pp. 297-301.
16. Talaat K.R., Karron R.A., Callahan K.A., Luke C.J., DiLorenzo S.C., Chen G.L., Lamirande E.W., Jin H., Coelingh K.L., Murphy B.R., Kemble G., Subbarao K. A live attenuated H7N3 influenza virus vaccine is well tolerated and immunogenic in a Phase I trial in healthy adults. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 28, pp. 3744-3753.

17. Terajima M., Babon J.A., Ennis F.A. Epidemiology of the influenza A virus H5N1 subtype and memory of immunity to the H2N2 subtype. *MBio.*, 2012, Vol. 3, no. 4.
18. Tokiko Watanabe, Shinji Watanabe, Eileen A. Maher, Gabriele Neumann and Yoshihiro Kawaoka. Pandemic potential of avian influenza A (H7N9) viruses. *Trends in Microbiology*, 2014, Vol. 22, Iss. 11, pp. 623-631.
19. Update: influenza A(H3N2) transmission and guidelines – five states, 2011. *Morb. Mort. Weekly Rep.* 2012/60(51). pp. 1741-1744.
20. World Health Organization: Influenza A(H1N1) press briefings. http://www.who.int/mediacentre/influenzaAH1N1_presstranscript_20090611.pdf?ua=1
21. WHO Seroepidemiological studies of pandemic influenza A (H1N1)2009 virus – *Weekly Epidemiological Record*, 2010, Vol. 85, no. 24, pp. 229-236.
22. Who global action plan vaccine supple for influenza vaccine. 2006, Geneva, Belgium. WHO/IVB/06.13. WHO/ODS/EPR/GIP/2006.1.
23. (<http://www.who.int/csr/disease/avianinfluenza/country/cases.table2008.03.18/en/indexhtml>)

Авторы:

Лосев И.В. — научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Донина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Петухова Г.Д. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кореньков Д.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Григорьева Е.П. — к.м.н., старший научный сотрудник, отдел вирусологии, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Дорошенко Е.М. — к.м.н., научный сотрудник, отдел вирусологии им. акад. РАМН А.А. Смородинцева, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Руденко Л.Г. — д.м.н., профессор, руководитель отдела вирусологии, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Найхин А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии, ФГБУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Losev I.V., Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Donina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Korenkov D.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylactics of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Grigorieva E.P., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of General Virology, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Doroshenko E.M., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Vaccine Strains, A.Smorodintsev Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Rudenko L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Naykhin A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.06.2015
Принята к печати 02.07.2015

Received 25.06.2015
Accepted 02.07.2015

УРОВНИ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ И ИХ СВЯЗЬ С КЛЕТОЧНЫМ И ГУМОРАЛЬНЫМ ЗВЕНОМ АНТИЭНДОТОКСИНОВОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ СИСТЕМНОЙ КРАСНОЙ ВОЛЧАНКОЙ

Шадуро Д.В., Белоглазов В.А., Гордиенко А.И.

Медицинская академия им. С.И. Георгиевского; ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Резюме. Системная красная волчанка на современном этапе занимает ведущее место среди системных аутоиммунных патологий. Несмотря на существенный прогресс в понимании основных звеньев патогенеза системной красной волчанки, многие аспекты субтильных механизмов прогрессирования волчаночного воспаления по-прежнему остаются неизвестными. На роль персистентных факторов самоподдержания аутоиммунного воспаления может претендовать липополисахарид или эндотоксин грамотрицательных кишечных бактерий. Цель работы заключалась в изучении уровней основных субпопуляций лимфоцитов, их возможной связи со специфическими антиэндотоксиновыми антителами и эндотоксин-нейтрализующими рецепторами гранулоцитов и моноцитов периферической крови больных системной красной волчанкой. В исследовании участвовало 48 больных СКВ. Методами проточной цитофлуорометрии и иммуноферментного анализа был определен уровень субпопуляций лимфоцитов, уровни экспрессии антиэндотоксиновых рецепторов на моноцитах и гранулоцитах, а также уровни общих и антиэндотоксиновых иммуноглобулинов. В ходе исследования нами выявлено увеличение уровня общих, активированных и цитотоксических Т-лимфоцитов, снижение В-лимфоцитов и НК-клеток, снижение эндотоксин-связывающих рецепторов на моноцитах и гранулоцитах, увеличение антиэндотоксиновых антител класса G. Выявлены корреляционные связи между уровнем эндотоксин-связывающих рецепторов на лейкоцитах и уровнем В-лимфоцитов, антиэндотоксиновых антител класса M с уровнем В-лимфоцитов и цитотоксических Т-лимфоцитов, антиэндотоксиновых антител класса G с уровнем CD4⁺ лимфоцитов. Существенные нарушения в состоянии антиэндотоксинового иммунитета у больных СКВ свидетельствуют, что данный дисбаланс может играть важную роль в механизмах формирования и прогрессирования аутоиммунной патологии.

Ключевые слова: эндотоксин, системная красная волчанка, лимфоциты, иммуноглобулины, антиэндотоксин-связывающий потенциал

Адрес для переписки:

Шадуро Денис Владимирович
Медицинская академия им. С.И. Георгиевского;
ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет
им. В.И. Вернадского»
295003, Россия, Республика Крым, г. Симферополь,
буль. Ленина, 5/7.
Тел.: 8 (978) 823-99-76.
E-mail: shadden@mail.ru

Address for correspondence:

Shaduro Denis V.
S.I. Georgievsky Medical Academy; V.I. Vernadsky Crimean
Federal University
295003, Russian Federation, Republic of Crimea, Simferopol,
Lenin Blvrd, 5/7.
Phone: 7 (978) 823-99-76.
E-mail: shadden@mail.ru

Образец цитирования:

Д.В. Шадуро, В.А. Белоглазов, А.И. Гордиенко, «Уровни основных субпопуляций лимфоцитов и их связь с клеточным и гуморальным звеном антиэндотоксинового иммунитета у больных системной красной волчанкой» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 359–366.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-359-366

© Шадуро Д.В. и соавт., 2015

For citation:

D.V. Shaduro, V.A. Beloglazov, A.I. Gordienko,
“Major lymphocyte subpopulations in patients with systemic lupus
erythematosus and their associations with cellular and humoral
anti-endotoxin immunity”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 359–366.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-359-366

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-359-366>

MAJOR LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS AND THEIR ASSOCIATIONS WITH CELLULAR AND HUMORAL ANTI-ENDOTOXIN IMMUNITY

Shaduro D.V., Beloglazov V.A., Gordienko A.I.

S.I. Georgievsky Medical Academy; V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Abstract. At the present time, systemic lupus erythematosus (SLE) takes the leading place among systemic autoimmune disorders. Despite considerable progress in understanding basic pathogenesis of this disease, many subtle mechanisms of progressive inflammation in SLE are still unknown. It has been discovered that the persistent self-maintenance factors of autoimmune inflammation could be represented by lipopolysaccharides or endotoxins of Gram-negative intestinal bacteria. The objective of this study was to assess the levels of major lymphocyte subpopulations, and their probable relation to specific anti-endotoxin antibodies and endotoxin-neutralizing receptors of granulocytes and monocytes in peripheral blood of SLE patients. The study involved forty-eight patients with SLE. The levels of lymphocyte subpopulations, expression of monocyte and granulocyte anti-endotoxin receptors, amounts of total and endotoxin-specific immunoglobulins were determined by means of, respectively, cytometric analysis and enzyme immunoassay techniques. The results of study have shown an increase in overall numbers of activated and cytotoxic T lymphocytes, a decrease in lymphocytes and NK-cells, diminished levels endotoxin-binding receptors on the monocytes and granulocytes, along with increased anti-endotoxin IgG antibodies. Our study revealed correlations between the levels of the leukocyte endotoxin-binding receptors, and B-lymphocyte contents, like as some associations between anti-endotoxin IgM antibodies, and the levels of B-lymphocytes, and cytotoxic T-lymphocytes. A correlation was also found between anti-endotoxin IgG antibodies and CD4⁺ lymphocyte levels. Significant alterations of the endotoxin-specific immunity among SLE patients suggest that this imbalance might play an important role in the mechanisms of onset and progression of autoimmune diseases.

Keywords: endotoxin, systemic lupus erythematosus, lymphocytes, immunoglobulins, anti-endotoxin binding potential

Введение

Системная красная волчанка (СКВ) на современном этапе занимает ведущее место среди системных аутоиммунных патологий. В настоящее время болезнь имеет четкую тенденцию к манифестации в более раннем возрасте и характеризуется, как правило, тяжелым течением, нередко резистентным к проводимой базисной терапии [3]. Хотя за последние 60 лет 5- и 10-летняя выживаемость пациентов увеличилась с 74,8 до 94,8% и с 63,2 до 91,4% соответственно [13].

Все это побуждает исследователей к поиску новых возможных механизмов самоподдержания органонеспецифического аутоиммунного воспаления, а также поиску методов патогенетической коррекции, включая и биологическую терапию моноклональными антителами.

Несмотря на существенный прогресс в понимании основных звеньев патогенеза системной красной волчанки, многие аспекты субтильных

механизмов прогрессирования волчаночного воспаления по-прежнему остаются неизвестными [17]. На роль персистентных факторов самоподдержания аутоиммунного воспаления может претендовать липополисахарид (ЛПС) или эндотоксин (ЭТ) грамотрицательных кишечных бактерий, основным резервуаром которого в организме человека является кишечная микрофлора. Известно, что ЭТ является мощнейшим провоспалительным фактором и способен приводить к неспецифической поликлональной В- и Т-лимфоцитарной активации [7, 14]. Интегральный эффект определяется балансом между его поступлением во внутренние среды организма и активностью ЭТ-нейтрализующих систем

Цель данной работы заключалась в изучении уровней основных субпопуляций лимфоцитов и их связи со специфическими антиэндотоксиновыми антителами и специфическими эндотоксин-нейтрализующими рецепторами гранулоци-

тов и моноцитов периферической крови больных СКВ.

Материалы и методы

Нами было обследовано 48 пациентов ревматологического отделения КРУ КТМО «Университетская клиника» г. Симферополя, с диагнозом: СКВ I-II степени активности в период с 2011 по 2014 год. Контрольную группу составили 40 относительно здоровых доноров. Материалом исследования послужила цельная цитрированная периферическая кровь и свежзамороженная сыворотка крови, полученная методом центрифугирования цельной крови, взятые с письменного разрешения пациентов и доноров и доставленные в лабораторию клинической иммунологии ЦНИЛ ГУ «Крымский государственный медицинский университет имени С.И. Георгиевского» с соблюдением холодовой цепочки.

Средний возраст больных составил $36,4 \pm 1,8$ года, продолжительность заболевания соста-

вила $8,0 \pm 1,4$ года, катамнез болезни от 0,5 года до 25 лет. Женщины преобладали в исследовании и составили 89,6%. Распределение больных по степени активности заболевания составило: I степень 41,7%, II степень 58,3%. При этом 68,9% пациентов находились на базисной терапии (азатиоприн – 16 человек, плаквенил – 11, циклофосфан – 3, метотрексат – 2 и мофетила микофенолат – 1). Большинство пациентов (93,75%) находились на глюкокортикостероидной терапии метилпреднизолоном в средней суточной дозировке 12,9 мг, 4 человека (6,25%) не принимали гормональные препараты, находясь на базисной терапии одним из вышеперечисленных препаратов.

Субпопуляции лейкоцитов ($CD3^+$, $CD19^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD3^+$ HLA-DR⁺, $CD3^+/16^+/56^+$, $CD3^-/16^+56^+$) изучали методом проточной лазерной цитофлуориметрии (PAS-III; Partec, Germany) с использованием флуоресцентных конъюгатов моноклональных антител фирмы

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ СКВ И ЛИЦ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ (%)

Показатель	СКВ	Контроль	Достоверность	
	M±m	M±m	t -критерий Стьюдента	U-критерий Манна-Уитни-Вилкоксона
CD3 ⁺	73,03±0,96	63,17±1,81	p < 0,001	–
CD19 ⁺	4,57±0,56* (2,96-5,86)	5,81±0,30	–	p = 0,004
CD4 ⁺	39,56±1,42	36,06±1,48	p = 0,093	–
CD8 ⁺	35,13±1,78	23,26±1,42	p < 0,001	–
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	0,295±0,04* (0,225-0,39)	0,251±0,02	–	p = 0,017
CD3 ⁺ /16 ⁺ /56 ⁺	0,50±0,02	0,48±0,06	p = 0,698	–
CD3 ⁻ /16 ⁺ 56 ⁺	8,25±0,76	10,71±0,77	p = 0,026	–

Примечание. * – медиана, в скобках – I и III квантили.

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ СПЕЦИФИЧЕСКИХ АНТИЭНДОКСИНОВЫХ АНТИТЕЛ КЛАССА А, М И G У БОЛЬНЫХ СКВ И ЛИЦ КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЫ (ед. опт. пл.)

Значение	СКВ M±m	Контроль M±m	U-критерий Манна-Уитни-Вилкоксона
анти-ЛПС IgA	0,186±0,011	0,195±0,034* (0,124-0,334)	p = 0,211
анти-ЛПС IgM	0,155±0,024* (0,081-0,274)	0,278±0,033	p = 0,072
анти-ЛПС IgG	0,744±0,041	0,299± 0,07* (0,157-0,613)	p < 0,001

Примечание. * – медиана, в скобках – I и III квантили.

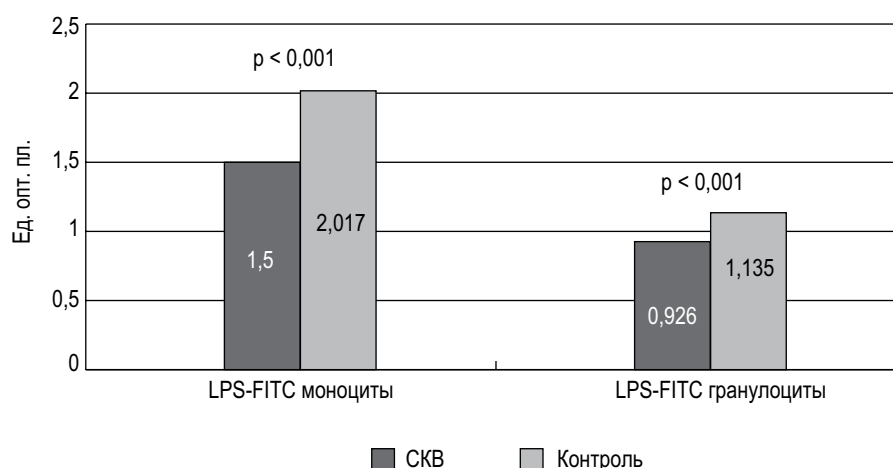


Рисунок 1. Уровни экспрессии эндотоксин-связывающих рецепторов на моноцитах и гранулоцитах больных СКВ и лиц контрольной группы (ед. опт. пл.)

“DakoCytomation, Denmark A/S”, полученные результаты выражали в % [1].

Клеточное звено антиэндотоксинового иммунитета изучалось методом проточной лазерной цитофлуориметрии (PAS-III; Partec, Germany), с использованием в качестве флуоресцентного зонда конъюгат липополисахарида с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC), при этом исследовали уровень экспрессии эндотоксин-связывающего потенциала (LPS- FITC) на моноцитах и гранулоцитах периферической крови, полученные результаты выражали в единицах оптической плотности (ед. оп. пл.) [1].

Гуморальное звено антиэндотоксинового иммунитета изучалось методом определения специфических антител классов А, М и G (соответственно анти-ЛПС-IgA, анти-ЛПС-IgM и анти-ЛПС-IgG) при помощи твердофазного иммуноферментного анализа, применяя протоколы, разработанные на базе лаборатории клинической иммунологии КГМУ. В качестве антигена использовали коммерческий препарат ЛПС Escherichia coli K235 (Sigma Chem. Co., USA). Уровни данных антител выражали в условных единицах оптической плотности при длине волны 492 нм.

Результаты

В ходе изучения уровней субпопуляций лимфоцитов были получены следующие результаты, представленные в таблице 1. При этом достоверные различия уровней дифференцированных молекул лимфоцитов у больных СКВ по сравнению с лицами контрольной группы были представлены субпопуляциями CD3⁺, CD19⁺, CD8⁺, CD3⁺ HLA-DR⁺ и CD3⁺/16⁺56⁺.

Количество общих Т-лимфоцитов (CD3⁺), у больных СКВ было выше на 15,6%. Количество активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺ HLA-DR⁺) оказалось выше на 17,53%, а количество цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺) — выше на 51,1%, чем у лиц контрольной группы. Количество В-лимфоцитов (CD19⁺) оказалось на 21,3% ниже, чем у лиц контрольной группы. Также сниженным на 23% у больных СКВ оказался уровень NK-клеток (CD3⁺/16⁺56⁺). Соотношение индекса CD4⁺/CD8⁺ в среднем составляло 1,14 и не отличалось достоверно от величины этого показателя в норме.

В ходе исследования уровня специфических антиэндотоксиновых антител классов А, М и G были получены следующие результаты, представленные в таблице 2.

При изучении специфических антиэндотоксиновых антител классов А, М и G в периферической крови было установлено, что достоверно уровень анти-ЛПС-IgA и анти-ЛПС-IgM у больных СКВ не отличался от такового показателя в контрольной группе. При этом достоверное отличие уровня антител у больных СКВ было выявлено только при изучении анти-ЛПС IgG, уровень которого оказался в 2,5 раза выше, чем в группе сравнения.

При изучении клеточного звена антиэндотоксинового иммунитета, а именно липополисахарид-связывающего потенциала на моноцитах и гранулоцитах, было выявлено их достоверное снижение на 25,63 и 18,41% соответственно, по сравнению с группой контроля. Результаты представлены на рисунке 1.

При исследовании корреляционных связей между вышеперечисленными данными были по-

лучены следующие результаты: достоверная отрицательная взаимосвязь выявлена между уровнем экспрессии LPS-FITC на моноцитах и уровнем В-лимфоцитов (CD19⁺), показатель ранговой корреляции Спирмена составил $R_o = -0,291$, на уровне значимости $p = 0,05$. Уравнение линейной регрессии имеет вид: $CD19^+ = 8,422 - 2,3156 * LPS-FITC_{мон.}$, коэффициент детерминации 0,089. Соответствующая обратная связь была выявлена между уровнем экспрессии LPS-FITC на гранулоцитах и уровнем В-лимфоцитов (CD19⁺). Показатель ранговой корреляции Спирмена составил $R_o = -0,347$, на уровне значимости $p = 0,02$. Уравнение линейной регрессии имеет вид: $CD19^+ = 13,62 - 9,19 * LPS-FITC_{гран.}$ + 8,422, коэффициент детерминации 0,094.

Отрицательные взаимосвязи выявлены также между уровнем Анти-ЛПС IgM и уровнем цитотоксических лимфоцитов (CD8⁺). Показатель ранговой корреляции Спирмена $R_o = -0,400$, на уровне значимости $p < 0,01$. Формула зависимости: $CD8^+ = 41,24 - 31,72 * Анти-ЛПС\ IgM$, коэффициентом детерминации 0,116. А также между Т-супрессорными лимфоцитами CD4⁺ и уровнем Анти-ЛПС IgG, коэффициент корреляции Пирсона составил $R = -0,305$, на уровне значимости $p = 0,035$. Уравнение линейной регрессии: $CD4^+ = 47,33 - 10,455 * Анти-ЛПС\ IgG$, коэффициент детерминации 0,093.

Прямая корреляционная зависимость была обнаружена между уровнем В-лимфоцитов (CD19⁺) и уровнем Анти-ЛПС IgM. Коэффициент корреляции Пирсона $R = 0,306$ на уровне значимости $p = 0,034$. Уравнение линейной регрессии имеет вид: $Анти-ЛПС\ IgM = 0,128 + 0,013 * CD19^+$, с коэффициентом детерминации 0,094.

Обсуждение

Исходя из полученных результатов, выявлено достоверное увеличение количества общих Т-лимфоцитов, активированных Т-лимфоцитов. Хотя многими авторами описаны противоречивые данные об изменении уровней субпопуляций данных лимфоцитов. Так, в большинстве исследований выявлено снижение числа как общих Т-лимфоцитов, так и активированных Т-лимфоцитов [5], особенно при изучении хронической и дискоидной формы красной волчанки, при этом снижение данных лимфоцитов наблюдается в большей мере при переходе заболевания в активную и атрофическую стадию [6].

По нашему мнению, умеренное увеличение субпопуляций данных лимфоцитов в нашем исследовании может охарактеризовать состояние

активности заболевания как низкое и умеренное, что соответствует степени активности СКВ у исследованных пациентов. Также существуют несколько схожих исследований, описывающих увеличение общего количества Т-лимфоцитов и трактующих их с позиции основного патогенетического механизма возникновения и самоподдержания аутоиммунного процесса — поликлональной Т- и В-активации и пролиферации [12]. Особо следует отметить увеличение числа цитотоксических лимфоцитов на 51,1% по сравнению с лицами контрольной группы, что соответствует большинству данных других исследователей [4, 11] и полностью совпадает с общепринятой картиной изменения иммунограммы при СКВ.

Также в данном исследовании было обнаружено снижение субпопуляции НК-клеток у больных СКВ на 23% по сравнению с лицами контрольной группы. Известно, что данные лимфоциты при СКВ обладают протекторным свойством. Novak J. и соавт. (2011) выявили снижение данной популяции лимфоцитов при аутоиммунных процессах в лабораторных условиях в исследовании на мышах, а также доказали их протекторные свойства в развитии аутоиммунных патологий, за счет секреции ингибиторного цитокина IL-4 [15]. Поэтому уровень данных клеток при СКВ имеет большое диагностическое и терапевтическое значение на современном этапе.

Следующим изменением было выявленное снижение субпопуляций В-лимфоцитов в периферической крови больных СКВ. Ранее считалось, что СКВ характеризуется избыточной пролиферацией В-лимфоцитов и является основным субстратом возникновения данной патологии, но современные данные подтверждают, что в патогенезе СКВ более важным является не общий уровень В-лимфоцитов, а их качественный состав и функциональная активность [16]. При этом исследовании у больных СКВ также была выявлена В-лимфопения. Мы считаем, что снижение данной субпопуляции является закономерным, в связи с переходом нативных В-лимфоцитов (CD19⁺/CD27⁻) в активированные и в дальнейшем в плазматические. Считается, что именно длительно живущие плазматические клетки синтезируют антинуклеарные антитела при СКВ, резистентны к современной иммуносупрессивной терапии [8]. По данным Gao N. и соавт. (2014), именно патология В-лимфоцитов является основным звеном волчаночного воспаления, а патология Т-клеточного звена является инициационным и/или самоподдерживающим механизмом [9].

Как было сказано ранее, мощным активатором пролиферации В- и Т-лимфоцитов является ЭТ [7, 14], поэтому в данном исследовании изучалась напряженность клеточного и гуморального звена антиэндотоксинового иммунитета как наиболее достоверного критерия хронического влияния ЭТ на организм больных СКВ. При этом нами был выявлен дисбаланс данного специфического иммунитета, представленный в виде достоверного увеличения продукции антиэндотоксиновых антител класса G, что на фоне нормативного уровня антиэндотоксиновых антител класса M подтверждает хроническое воздействие ЭТ на организм пациентов с СКВ, учитывая, что на кишечные бактерии не развивается длительного напряженного иммунитета.

Следующим достоверным изменением в иммунограмме оказалось увеличение на 17,53% количества активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺) у больных СКВ. Как известно, наличие маркера HLA-DR на Т-лимфоцитах свидетельствует об их поздней и длительной активации. Также перманентное увеличение данных клеток является показателем наличия постоянного антигенного раздражения и свидетельствует о хроническом воспалительном процессе в организме, что полностью соответствует патогенезу СКВ. В настоящее время определение уровня активированных Т-лимфоцитов имеет большое значение в диагностике и расчете прогноза течения аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний. Так, снижение уровня данных клеток при назначении лечения является благоприятным фактором прогноза при другом аутоиммунном заболевании — ревматоидном артрите, а увеличение количества данных клеток сопровождается ухудшением общего состояния пациента и усилению неврологической симптоматики. Увеличение количества данных клеток у больных СКВ свидетельствует о персистирующем иммунном воспалительном процессе, а изменение их динамики может являться дополнительным методом мониторинга состояния больного и ответа на лечение.

При изучении клеточного звена данного иммунитета также выявлена патология, заключающаяся в снижении специфических эндотоксин-связывающих рецепторов на клетках миелоидного ряда. Уровень экспрессии свидетельствует о функциональном состоянии клеток иммунной системы в борьбе с ЭТ. Существуют данные, что уровень данных рецепторов снижается в условиях их функциональной блокировки избытком ЭТ (занятости лиганда) [2], а также при длительном хроническом избытке ЭТ посред-

ством обратной связи. Снижение LPS-FITC на миелоидных клетках может способствовать снижению детоксикации ЭТ, гиперпродукции провоспалительных цитокинов и медиаторов воспаления, что поддерживает и усугубляет клинические проявления аутоиммунного процесса, в том числе и волчаночного [10].

Интегральный эффект дисбаланса антиэндотоксинового иммунитета на течение волчаночного воспаления подтверждается обнаруженными корреляционными связями, а именно — обратной зависимостью между уровнем В-лимфоцитов и экспрессией эндотоксин-связывающих рецепторов. Из этого следует, чем выше будет уровень экспрессии LPS-FITC, тем ниже будет количество В-лимфоцитов. Учитывая эту связь, можно предположить, что нивелирование хронического воздействия ЭТ будет иметь двойное патогенетическое и терапевтическое действие: снижение прямого раздражения и активации В-лимфоцитов, а также увеличение свободных ЭТ-связывающих рецепторов, которые в свою очередь могут взаимно снижать активацию В-лимфоцитов.

При изучении связи гуморального звена антиэндотоксинового с общим клеточным звеном иммунитета, выявлено, что высокий уровень анти-ЛПС IgM способствует снижению уровня цитотоксических лимфоцитов, а переключение механизмов иммунного ответа на синтез специфических антител следующего класса (анти-ЛПС IgG) повышает уровень данных лимфоцитов. При том выявлена обратная зависимость между уровнями анти-ЛПС IgG и CD4⁺ лимфоцитами, низкая активность которых напрямую влияет на цитотоксические и В-лимфоцитарные клетки. Общая картина данных взаимосвязей показывает крайне сильное, однонаправленное негативное влияние данных антител и, соответственно, ЭТ на стимуляцию клеточного звена общего иммунитета, что усугубляет и может поддерживать аутоиммунное воспаление при СКВ.

Выводы

Выявленные существенные нарушения специфического клеточного и гуморального антиэндотоксинового иммунитета у больных СКВ, а также обнаруженные корреляционные связи с общим иммунитетом, свидетельствуют о том, что данный дисбаланс может играть важную роль в механизмах формирования и прогрессирования аутоиммунной патологии и может выступать как дополнительный триггер развития и самоподдержания аутоиммунных процессов.

Список литературы / References

1. Гордиенко А.И. Улучшенный метод получения флуоресцентного зонда для определения липополисахарид-связывающих рецепторов методом проточной лазерной цитофлуориметрии // Таврический медико-биологический вестник, 2007. Т. 10. №4. С. 156-160. [Gordienko A.I. Improved method for producing a fluorescent probe to determine the lipopolysaccharide-binding receptors by flow cytometry laser. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskii vestnik = Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik*, 2007, Vol. 10, no. 4, pp. 156-160. (In Russ.)]
2. Гордиенко А.И., Копаянко А.И., Бакова А.А., Химич Н.В.. Влияние комплексного лечения с применением пробиотиков и энтеросорбентов на эндотоксин-связывающий потенциал лейкоцитов и эндогенную интоксикацию у пациентов с передним увеитом, ассоциированным с HLA-B27 антигеном // Таврический медико-биологический вестник, 2012. Т. 15, №2, ч. 3 (58). С. 75-78. [Gordienko A.I., Kopayenko A.I., Bakova A.A., Khimich N.V. Influencing of complex treatment with probiotics and enterosorbents on endotoxin-binding capacity of leucocytes and endogenous intoxication in patients with HLA-B27 associated anterior uveitis. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskii vestnik = Tavrisheskiy Mediko-Biologicheskii Vestnik*, 2012, Vol. 15, no. 2 (58), pp. 75-78. (In Russ.)]
3. Клюквина Н.Г., Насонов Е.Л. Фармакотерапия системной красной волчанки: современные рекомендации // Русский медицинский журнал, 2010. Т.18, № 18. С. 1108-1113. [Klykvina N.G. Nasonov E.L. Pharmacotherapy of systemic lupus erythematosus: current recommendations. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2010, Vol. 18, no. 18, pp. 1108-1113. (In Russ.)]
4. Кравченко П.Н., Олейник Е.К. Система регуляторных Т-клеток и аутоиммунные процессы // Труды Карельского научного центра РАН, 2013. № 3. С. 18-30. [Kravchenko P.N., Oleinik E.K. The system of regulatory t cells and autoimmunity. *Trudy Karelskogo nauchnogo tsentra RAN = Transactions of Karelian Research Centre of RAS*, 2013, no. 3, pp.18-30. (In Russ.)]
5. Романова Н.В. Полисиндромность системной красной волчанки и фенотип лимфоцитов // Фундаментальные исследования, 2004. № 2. С. 92-93. [Romanova N.V. Polysyndromic of systemic lupus erythematosus and lymphocyte phenotype. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2004, no. 2., pp. 92-93. (In Russ.)]
6. Савенкова В.В., Солошенко Е.М., Білоторов О.П. Характеристика імунного статусу хворих на хронічний червоний вовчак залежно від стадії захворювання // Дерматологія та венерологія, 2013. № 3 (61). С. 77-83. [Savenkova V.V., Soloshenko E.M., Bilozorov O.P. Characteristics of immune status of patients with chronic lupus erythematosus depending on the stage of disease. *Dermatologiya ta venerologiya = Dermatology and Venereology*, 2013, no. 3 (61), pp. 77-83. (In Russ.)]
7. Bucala R. Polyclonal activation of B lymphocytes by lipopolysaccharide requires macrophage-derived interleukin-1. *Immunology*, 1992, Vol. 77, no. 4, pp. 477-482.
8. Fan H., Liu F., Dong G., Ren D., Xu Y., Dou J., Wang T., Sun L., Hou Y. Activation-induced necroptosis contributes to B-cell lymphopenia in active systemic lupus erythematosus. *Cell. Death. Dis.*, 2014, Vol. 5, no. 9, p. 375.
9. Gao N., Dresel J., Eckstein V., Gallert R., Störch H., Venigalla R.K.C., Schwenger V., Max R., Blank N., Lorenz H.-M., Tretter T. Impaired suppressive capacity of activation-induced regulatory B cells in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, 2014, Vol. 66, no. 10, pp. 2849-2861.
10. Granholm N.A., Cavallo T. Long-lasting effects of bacterial lipopolysaccharide promote progression of lupus nephritis in NZB/W mice. *Lupus*, 1994, Vol. 3, no. 6, pp. 507-514.
11. Hu S., Tao D., He P. Immunophenotyping of lymphocyte T and B in the peripheral blood of systemic lupus erythematosus. *J. Tongji. Med. Univ.*, 2001, Vol. 21, no. 2, pp. 108-109.
12. Kammer G.M., Perl A., Richardson B.C., Tsokos G.C. Abnormal T cell signal transduction in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.*, 2002, Vol. 46, no. 5, pp. 1139-1154.
13. Mak A., Cheung M.W., Chiew H.J., Liu Y. Global trend of survival and damage of systemic lupus erythematosus: metaanalysis and metaression of observational studies from the 1950 to 2000. *Semin. Arthr. Rheum.*, 2012, Vol. 41, pp. 830-839.
14. Mattern T., Flad H.-D., Brade L., Rietschel E.T., Ulmer A.J. Stimulation of human T-lymphocytes by LPS is MHC unrestricted but strongly dependent on B7 interaction. *Immunology*, 1998, Vol. 160, pp. 3412-3418.
15. Novak J., Lehuen A. Mechanism of regulation of autoimmunity by iNKT cells. *Cytokine*, 2011, Vol. 53, pp. 263-270.

16. Odendahl M., Jacobi A., Hansen A., Feist E., Hiepe F., Burmester G.R., Lipsky P.E., Radbruch A., Dörner T. Disturbed peripheral B lymphocyte homeostasis in systemic lupus erythematosus. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 165, no. 10, pp. 5970-5979.
17. Sabry A., Sheashaa H., El-Husseini A., Mahmouda K., Eldahshana K.F., Georgea S.K., Abdel-Khaleka E., El-Shafeyb E.M., Abo-Zenahc H. Proinflammatory cytokines (TNF-alpha and IL-6 in Egyptian patients with SLE: Its correlation with disease activity. *Cytokine*, 2006, Vol. 4, pp. 722-727.

Авторы:

Шадуро Д.В. — ассистент, магистр, аспирант кафедры внутренней медицины № 2, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского; ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Белоглазов В.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой внутренней медицины № 2, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского; ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Гордиенко А.И. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, заведующий лабораторией клинической иммунологии, Медицинская академия им. С.И. Георгиевского; ФГАОУ ВО «Крымский федеральный университет им. В.И. Вернадского», г. Симферополь, Республика Крым, Россия

Authors:

Shaduro D.V., Assistant Professor, Master of Science, Postgraduate Student, Department of Internal Medicine № 2, S.I. Georgievsky Medical Academy; V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Beloglazov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Internal Medicine № 2, S.I. Georgievsky Medical Academy; V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Gordienko A.I., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Head, Laboratory of Clinical Immunology, S.I. Georgievsky Medical Academy; V.I. Vernadsky Crimean Federal University, Simferopol, Republic of Crimea, Russian Federation

Поступила 01.06.2015
Отправлена на доработку 25.06.2015
Принята к печати 06.07.2015

Received 01.06.2015
Revision received 25.06.2015
Accepted 06.07.2015

ВЛИЯНИЕ МОДИФИЦИРОВАННОГО БИОФЛАВОНОИДА НА ЛИМФОЦИТЫ-ЭФФЕКТОРЫ РЕАКЦИИ КОНТАКТНОЙ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ У МЫШЕЙ

Албегова Д.З.¹, Павлова С.И.^{2,3}, Лаптев О.С.², Негребетский В.В.¹,
Кягова А.А.¹, Козырь Л.А.¹, Албегова Ж.К.⁴, Козлов И.Г.^{1,2}

¹ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГУ «ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», Москва, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

⁴ ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения
РФ, г. Владикавказ, Республика Северная Осетия, Россия

Резюме. Реакция контактной чувствительности мышей (КЧ) к 2,4-динитрофторбензолу (ДНФБ) является моделью иммунного ответа *in vivo*, воспроизводящей заболевание контактный дерматит у человека. Считается, что иммунный ответ при развитии КЧ опосредуется преимущественно Т-лимфоцитами, поскольку эти клетки могут адоптивно переносить реакцию от сенсибилизированного экспериментального животного несенсибилизированному. КЧ проявляются в виде воспаления (обычно кожи) в месте повторного попадания антигена. В иммунопатогенезе КЧ выделяют две фазы: сенсибилизации (индуктивная, или афферентная фазы) и проявления иммунного воспаления (эфферентная фаза). Фаза сенсибилизации КЧ начинается после первичного контакта организма с антигеном, продолжительность которой у человека составляет 10-15 дней, у мыши — 5-7 дней. Фаза проявления КЧ (эффektorная) начинается при повторном контакте гаптена с организмом (накожная аппликация, либо внутри- или подкожные инъекции антигена). Повторное попадание сенсибилизирующего вещества в клетки кожи приводит к его узнаванию и запуску механизмов, приводящих к возникновению очага иммунного воспаления с участием ДНФБ-специфических эфektorных Т-лимфоцитов. Реакции достигают пика через 18-48 часов повторного контакта с гаптеном. В литературе очень мало сведений, касающихся влияния флавоноидов на течение КЧ, среди которых встречаются как стимулирующие, так и ингибиторные эффекты. Флавоноиды преимущественно обладали супрессивным эффектом в отношении развития КЧ. В нашей лаборатории модель контактной чувствительности воспроизводилась на мышах линии СВА, путем накожной сенсибилизации 2,4-динитрофторбензолом. Целью исследования стало выявление механизмов иммуномодулирующего дей-

Адрес для переписки:

Албегова Диана Заурбековна
ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: 8 (495) 434-44-92.
E-mail: bigbeaver-90@mail.ru

Address for correspondence:

Albegova Diana Z.
Russian National N.I. Pirogov Research Medical University
117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovitjanova str., 1.
Phone: 7 (495) 434-44-92.
E-mail: bigbeaver-90@mail.ru

Образец цитирования:

Д.З. Албегова, С.И. Павлова, О.С. Лаптев, В.В. Негребетский,
А.А. Кягова, Л.А. Козырь, Ж.К. Албегова, И.Г. Козлов,
«Влияние модифицированного биофлавоноида на лимфоциты-
эффektorы реакции контактной чувствительности
у мышей» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4.
С. 367-374. doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-367-374

© Албегова Д.З. и соавт., 2015

For citation:

D.Z. Albegova, S.I. Pavlova, O.S. Laptev, V.V. Negrebetsky,
A.A. Kyagova, L.A. Kozyr, J.K. Albegova, I.G. Kozlov, "Influence
of modified bioflavonoids upon effector lymphocytes in murine
model of contact sensitivity", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 3, pp. 367-374.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-367-374

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-367-374>

ствия кверцетина дигидрата и модифицированного биофлавоноида, используя метод адоптивного переноса контактной чувствительности спленocyтaми и Т-лимфоцитами. Как показали проведенные исследования, 30-минутная обработка спленocyтoв и Т-лимфоцитoв сенсибилизированных мышей модифицированным биофлавоноидом перед их переносом полностью отменяла развитие контактной чувствительности у сингенных мышей-реципиентов, при этом данный эффект не был связан с гибелью клеток вследствие индукции их апоптоза или цитотоксичности. Кверцетина дигидрат только частично супрессирует активность адаптивно сформированных Т-лимфоцитов-эффекторов контактной чувствительности.

Было показано, что модифицированный биофлавоноид в значительной степени сильнее подавляет адоптивный перенос контактной чувствительности в сравнении с кверцетина дигидратом, не вызывая апоптоза клеток-эффекторов.

Ключевые слова: флавоноиды, контактная гиперчувствительность, адоптивный перенос, лимфоциты, иммуномодуляция, иммуносупрессия

INFLUENCE OF MODIFIED BIOFLAVONOIDS UPON EFFECTOR LYMPHOCYTES IN MURINE MODEL OF CONTACT SENSITIVITY

Albegova D.Z.^a, Pavlova S.I.^{b,c}, Laptev O.S.^b, Negrebetsky V.V.^a,
Kyagova A.A.^a, Kozyr L.A.^a, Albegova J.K.^d, Kozlov I.G.^{a,b}

^a Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

^b Federal D. Rogachev Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^c Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

^d North-Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russian Federation

Abstract. Contact sensitivity reaction (CSR) to 2,4-dinitrofluorobenzene (DNFB) in mice is a model of *in vivo* immune response, being an experimental analogue to contact dermatitis in humans. CSR sensitization phase begins after primary contact with antigen, lasting for 10-15 days in humans, and 5-7 days, in mice. Repeated skin exposure to the sensitizing substance leads to its recognition and triggering immune inflammatory mechanisms involving DNFB-specific effector T lymphocytes. The CSR reaches its maximum 18-48 hours after re-exposure to a hapten. There is only scarce information in the literature about effects of flavonoids on CSR, including both stimulatory and inhibitory effects. Flavonoids possessed, predominantly, suppressive effects against the CSR development. In our laboratory, a model of contact sensitivity was reproduced in CBA mice by means of cutaneous sensitization by 2,4-dinitrofluorobenzene. The aim of the study was to identify the mechanisms of immunomodulatory action of quercetin dihydrate and modified bioflavonoids, using the method of adoptive transfer contact sensitivity by splenocytes and T-lymphocytes. As shown in our studies, a 30-min pre-treatment of splenocytes and T-lymphocytes from sensitized mice with modified bioflavonoids before the cell transfer caused complete prevention of contact sensitivity reaction in syngeneic recipient mice. Meanwhile, this effect was not associated with cell death induction due to apoptosis or cytotoxicity. Quercetin dihydrate caused only partially suppression the activity of adaptively formed T-lymphocytes, the contact sensitivity effectors.

It was shown that the modified bioflavonoid more stronger suppress adoptive transfer of contact sensitivity in comparison with quercetin dehydrate, without inducing apoptosis of effector cells.

Thus, the modified bioflavonoid is a promising compound for further studies in a model of contact sensitivity, due to its higher ability to suppress transfer of CSR with T-lymphocytes, as compared to quercetin dihydrate.

Keywords: flavonoids, contact hypersensitivity, adoptive transfer, lymphocytes, immunomodulation, immunosuppression

Флавоноиды представляют собой одно из самых структурно разнообразных (более 4000 индивидуальных представителей) семейств вторичных метаболитов растительной клетки полифенольной структуры. На сегодняшний день они рассматриваются как активные продукты метаболизма растений, играющие важную роль в процессах фотосинтеза, дыхания, формировании устойчивости к инфекционным агентам. Согласно результатам многочисленных современных исследований, можно утверждать, что эти природные соединения обладают широким диапазоном биологических активностей, проявляя противовоспалительные, иммуностропные, антиканцерогенные, противоопухолевые и многие другие свойства [2, 7]. Данные эффекты могут реализовываться благодаря тому, что флавоноиды влияют на фосфорилирование ключевых молекул сигнальных путей в клетках, ингибируя активность протеинтирозинкиназ [3]. В связи с этим мы предположили, что флавоноиды могут стать новым источником для изыскания лекарственных препаратов с иммуномодулирующей активностью.

В нашей лаборатории были проведены исследования с использованием модели контактной чувствительности (КЧ), индуцированной 2,4-динитрофторбензолом (ДНФБ) у мышей, где кверцетина дигидрат (КД) и модифицированный биофлавоноид (МБФ) с различной эффективностью подавляли развитие реакции КЧ. Ингибирование КЧ зависело от пути введения исследуемых агентов животным и максимально проявлялось при внутривенном введении [4]. В дальнейшем в этой же модели были предприняты попытки выяснения механизмов действия кверцетина дигидрата (КД) и модифицированного биофлавоноида (МБФ). С учетом многоэтапности реализации патогенеза реакции КЧ очевидно, что механизмы ограничения развития данной реакции под действием тех или иных иммуномодулирующих агентов могут быть многообразны. Целью данной работы являлось исследование возможного влияния изучаемых веществ на функциональную активность зрелых иммунокомпетентных клеток, участвующих в реализации КЧ. Для этого был использован метод адоптивного переноса, в основе которого лежит индукция КЧ при введении несенсибилизированному животному зрелых Т-лимфоцитов-эффекторов от сенсибилизированного сингенного донора.

Материалы и методы

Препараты

В опытах использован полученный экспериментальным путем модифицированный биофлавоноид, а также препарат сравнения – кверцетина дигидрат.

В клеточную суспензию вносили раствор КД или МБФ в этаноле (рабочая концентрация 5×10^{-8} моль/мл) так, чтобы финальная концентрация этанола не превышала 1%. В качестве контроля использовали соответствующие объемы растворителя. Во всех экспериментах после 30-минутной инкубации (37 °С, 5% CO₂) с препаратами клетки отмывали от тестируемых агентов и медленно вводили внутривенно мышам в объеме 0,5 мл раствора Хенкса с 10 мМ HEPES-буфера.

Лабораторные животные

В экспериментах были использованы мыши линии СВА (Н-2^к) (самцы весом 18-20 г, возраст 8-10 недель), полученные из питомника РАМН (Крюково, Московская область). Животные содержались на стандартном пищевом рационе вивария при свободном доступе к воде и пище.

Модель КЧ

Инициацию реакции КЧ к ДНФБ у мышей проводили согласно общепринятому экспериментальному подходу с незначительными модификациями [6]. Животных сенсибилизировали путем аппликации на выбритую кожу брюшка 50 мкл 0,3% раствора ДНФБ в ацетоне на 0 день. Через 6 суток после сенсибилизации на внутреннюю поверхность правого уха наносили разрешающую дозу ДНФБ (5 мкл 0,2%). На левое ухо наносили 5 мкл растворителя (ацетона). Отрицательным контролем (К⁻) служила группа интактных (несенсибилизированных) мышей, получивших только аппликацию разрешающей дозы ДНФБ. Через 24 часа после повторного нанесения ДНФБ оценивали интенсивность реакции КЧ по разнице отека правого и левого ушей (специфическое локальное воспаление). Толщину ушей измеряли в миллиметрах специальным микрометром, снабженным световым сигналом (Россия).

Адоптивный перенос КЧ

У сенсибилизированных ДНФБ мышей-доноров через 6 суток после сенсибилизации вы-

деляли клетки селезенки. Суспензию спленоцитов (3×10^7 кл/мышь, 0,5 мл) или их отдельную популяцию ($CD3^+$), выделенную из того же количества клеток селезенки, медленно внутривенно вводили в хвостовую вену intactным мышам-реципиентам. В опытной группе клетки инкубировали с КД или МБФ в течение 30 мин. при 37°C и $5\% \text{CO}_2$, в контрольной — с соответствующим объемом растворителя. Через 1 час после переноса клеточной суспензии мышам-реципиентам, включая intactных мышей (K^- , отрицательный контроль), наносили разрешающую дозу ДНФБ на внутреннюю поверхность уха. На внутреннюю поверхность другого уха в качестве контроля наносили такой же объем ацетона. Еще через 24 часа регистрировали интенсивность реакции КЧ мышей-реципиентов вышеописанным методом.

Иммуномагнитная сепарация

Для получения $CD3^+$ популяции спленоцитов использовали метод негативной селекции и набор реактивов Dynal Mouse Negative Isolation Kit (Invitrogen Dynal AS, Норвегия). Фракции клеток, не относящихся к интересующей популяции, удаляли, обрабатывая спленоциты кок-

тейлем моноклональных антител (IgG высокоспецифичные к поверхностным популяционным маркерам) и связывающими их парамагнитными полимерными микрочастицами Dynalbeads. Сепарацию проводили в магнитном поле штатива DynalMag-2 (Invitrogen Dynal AS, Норвегия). Очищенную популяцию, не прикрепившуюся к полимерным микрочастицам (в составе супернатанта), отмывали и после подсчета использовали для обработки исследуемыми агентами *in vitro*, а затем вводили внутривенно экспериментальным животным.

Контроль чистоты популяции осуществляли методом проточной цитометрии на цитофлуориметре Cytomics FC500 (Beckman-Coulter, США) с использованием флюорохром-меченых моноклональных антител к $CD3$ антигенам мышей (Invitrogen, США).

Оценка жизнеспособности и «раннего» апоптоза

Количественные исследования жизнеспособности и апоптоза клеток при воздействии изучаемого агента проводили методом проточной цитофлуориметрии, используя Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit (Beckman Coulter,

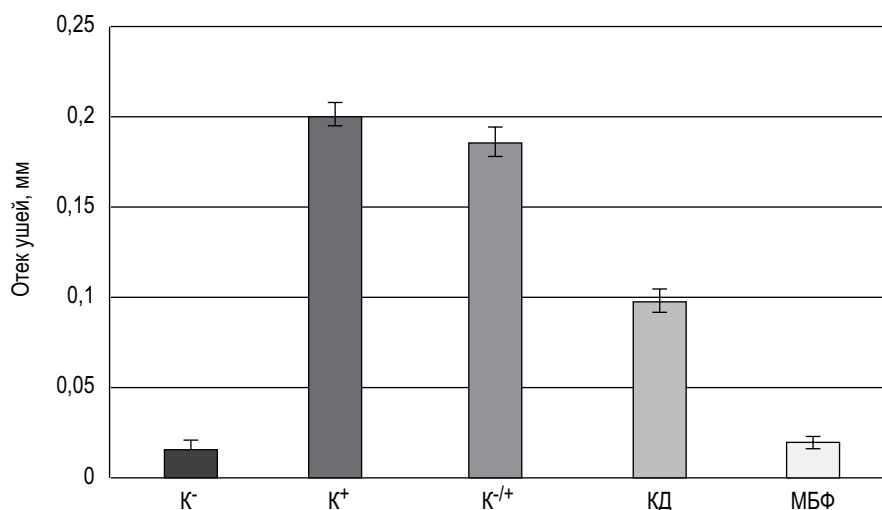


Рисунок 1. Интенсивность реакции при адоптивном переносе КЧ спленоцитами сенсibilизированных мышей-доноров intactным мышам-реципиентам

Примечание. (K^-) — отрицательный контроль; (K^+) — положительный контроль без адоптивного переноса; ($K^{-/-}$) — адоптивный перенос КЧ спленоцитами (3×10^7 /мышь); (КД) — адоптивный перенос спленоцитов, инкубированных с КД; (МБФ) — адоптивный перенос спленоцитов, инкубированных с МБФ.

США). Для анализа использовали аликвоты, содержащие 10^6 клеток.

Статистическая обработка

Для статистического анализа результатов использовалась программа Excel для Windows XP. Все результаты выражались как значения среднего $\pm$ стандартное отклонение. Полученные в ходе экспериментов данные распределялись по нормальному закону, поэтому для оценки достоверности различий применяли критерий Стьюдента, вычисляя коэффициент достоверности. Различие средних показателей считалось достоверным, если величина коэффициента достоверности соответствовала уровню значимости $P < 0,05$.

Результаты

Нами был использован метод адоптивного переноса реакции контактной чувствительности сингенным животным для изучения прямого влияния КД и МБФ на спленоциты мышей, а также на Т-лимфоциты, выделенные из суспензии спленоцитов с помощью иммуномагнитной сепарации.

Результаты экспериментов по адоптивному переносу КЧ спленоцитами сенсibilизированных мышей-доноров интактным мышам-реципиентам представлены на рисунке 1.

Как демонстрирует гистограмма, в группе К- аппликация разрешающей дозы ДНФБ не вызывала развития реакции КЧ: разница толщины ушей составляла $0,016 \pm 0,006$ мм. Напротив, перенос спленоцитов от сенсibilизированных ДНФБ доноров интактным мышам-реципиентам приводил к сенсibilизации, что проявлялось в развитии у последних КЧ уже при первичной аппликации ДНФБ на ухо. У мышей данной группы отек составил $0,186 \pm 0,008$ мм, что было сравнимо с интенсивностью КЧ в группе положительного контроля (K^+) без адоптивного переноса ($0,2 \pm 0,005$ мм). Однако в том случае, когда спленоциты предварительно (до введения мышам-реципиентам) инкубировали в течение 30 мин с МБФ, адоптивный перенос КЧ не наблюдался. Отек уха в этой группе мышей составлял в среднем $0,015 \pm 0,003$ мм, что достоверно не различалось с таковыми значениями в группе отрицательного контроля ($0,016 \pm 0,006$ мм), и было на 92% ($p < 0,05$) ниже в сравнении с группой $K^{-/+}$ (адоптивный перенос КЧ

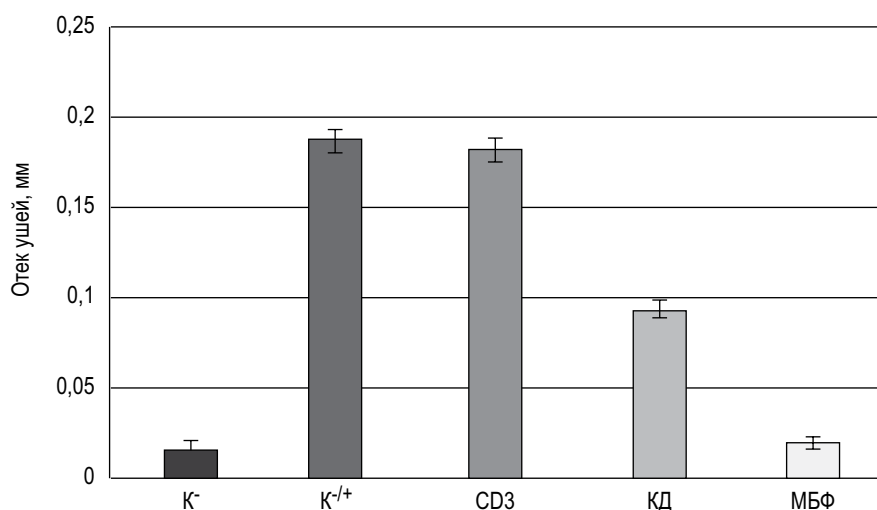


Рисунок 3. Интенсивность реакции при адоптивном переносе КЧ популяцией спленоцитов сенсibilизированных мышей-доноров интактным мышам-реципиентам

Примечание. (K-) – отрицательный контроль, ($K^{-/+}$) – адоптивный перенос КЧ спленоцитами, (CD3) – адоптивный перенос КЧ Т-лимфоцитами, (КД) – адоптивный перенос Т-лимфоцитов, инкубированных с КД, (МБФ) – адоптивный перенос Т-лимфоцитов, инкубированных с МБФ.

спленоцитами). В то время как преинкубация спленоцитов с КД, с последующим введением мышам-реципиентам, не отменяла адоптивного переноса КЧ. Отек уха в этой группе мышей составлял в среднем $0,098 \pm 0,006$ мм, что было ниже на 47% в сравнении с группой К^{-/+}.

Для оценки апоптогенного эффекта КД и МБФ, спленоциты инкубировали 0,5; 2; 6; 12 ч в их присутствии, затем окрашивали аннексин-ФИТЦ и пропидий йодидом. Ни в одной из проб не наблюдали повышения доли аннексин-положительных клеток при инкубации с исследуемыми агентами в сравнении с контрольными образцами (рис. 2, см. 3-ю обложку).

Следующим экспериментальным шагом стала иммуномагнитная сепарация Т-лимфоцитов из суспензии спленоцитов мышей, сенсibilизированных ДНФБ, с целью их адоптивного переноса интактным мышам.

Контроль чистоты выделенной популяции осуществляли методом проточной цитометрии с использованием флюорохром-меченых моноклональных антител к поверхностным маркерам мышинных лимфоцитов. При проведении цитометрического контроля чистота популяции составляла $93,0 \pm 1,0\%$.

Результаты экспериментов по изучению влияния КД и МБФ на адоптивный перенос КЧ Т-лимфоцитами представлены на рисунке 3. Как и предполагалось, Т-лимфоциты сенсibilизированных мышей эффективно переносили КЧ несенсibilизированным реципиентам. Выраженность реакции ($0,181 \pm 0,007$ мм) статистически не отличалась от группы с адоптивным переносом суммарной клеточной фракции спленоцитов ($0,186 \pm 0,008$ мм). Инкубация *in vitro* сепарированных Т-лимфоцитов с МБФ заблокировала способность этих клеток адоптивно переносить КЧ интактным мышам. Отек уха составил $0,016 \pm 0,004$ мм, что практически совпадало с аналогичным показателем в группе отрицательного контроля и было на 91,2% ($p < 0,05$) ниже в сравнении с группой Т-лимфоциты. По всей вероятности, МБФ супрессировал активность адаптивно сформированных Т-лимфоцитов-эффекторов КЧ.

Преинкубация *in vitro* сепарированных Т-лимфоцитов с КД полностью не отменяла

адоптивного переноса КЧ интактным мышам. Отек уха составил $0,092 \pm 0,005$ мм, что было на 50,5% ($p < 0,05$) ниже в сравнении с группой Т-лимфоциты. По всей вероятности, КД только частично супрессировал активность адоптивно сформированных Т-лимфоцитов-эффекторов КЧ.

Таким образом, в результате проведенного исследования можно сделать заключения:

1. Эксплантированные на 6 сутки спленоциты ДНФБ-сенсibilизированных мышей способны адоптивно переносить КЧ интактным мышам-реципиентам.

2. Инкубация с МБФ (5×10^{-8} моль/мл) *in vitro* эксплантированных на 6 сутки спленоцитов ДНФБ-сенсibilизированных мышей отменяет адоптивный перенос КЧ сингенным мышам-реципиентам. В свою очередь использование КД полностью не отменяло адоптивного переноса КЧ. Эффекты МБФ и КД не связаны с гибелью клеток.

3. Т-лимфоциты, выделенные из эксплантированных на 6 сутки спленоцитов ДНФБ-сенсibilизированных мышей, способны адоптивно переносить КЧ сингенным интактным мышам-реципиентам.

4. Инкубация с МБФ (5×10^{-8} моль/мл) *in vitro* сепарированных Т-лимфоцитов ингибирует адоптивный перенос КЧ сингенным мышам-реципиентам, тогда как КД только частично супрессирует активность адаптивно сформированных Т-лимфоцитов-эффекторов КЧ.

Обсуждение

Используя методику адоптивного переноса КЧ, было изучено прямое влияние КД и МБФ на суммарную фракцию спленоцитов мышей, полученную спустя 6 суток после сенсibilизации ДНФБ, а также на Т-лимфоциты, выделенные из суспензии этих спленоцитов с помощью иммуномагнитной сепарации.

В контрольной группе реакция КЧ достоверно переносилась спленоцитами ДНФБ-сенсibilизированных мышей-доноров сингенным интактным мышам-реципиентам при внутривенном введении их в количестве свыше 2×10^7 клеток в расчете на 1 мышь. При адоптив-

ном переносе 10^8 спленоцитов/мышь развивался отек уха такой же выраженности, как в группе мышей КЧ (инициация КЧ и ее разрешение в одном и том же животном). В том случае, когда переносили меньшее количество спленоцитов, наблюдалась незначительная тенденция к снижению интенсивности реакции. Исходя из этих предварительных результатов, в данной работе для адоптивного переноса КЧ использовали 3×10^7 клеток в расчете на 1 мышь. Сепарация и перенос Т-лимфоцитов проводились из такого же количества спленоцитов.

Как показали проведенные исследования, 30-минутная обработка спленоцитов сенсibilизированных мышей МБФ перед их переносом полностью отменяла развитие КЧ у сингенных мышей-реципиентов, при этом данный эффект не был связан с гибелью клеток вследствие индукции их апоптоза или цитотоксичности.

Представленные в литературе сведения, касающиеся фенотипа клеток, являющихся эффекторами КЧ, противоречивы. Предполагается, что фенотип индуцированных клеток-эффекторов КЧ зависит, прежде всего, от вида гаптена,

а также от генетических особенностей сенсibilизированного организма. Тем не менее, большинство исследований показывают, что сенсibilизация мышей ДНФБ приводит к генерации клеток-эффекторов КЧ, имеющих фенотип $CD8^+$ [1, 5].

Как и следовало ожидать исходя из данных литературы, в контрольной группе реакция КЧ эффективно переносилась также отдельно Т-лимфоцитами, поэтому нашей дальнейшей целью является выделение субпопуляций $CD8^+$ и $CD4^+$ из суспензии спленоцитов сенсibilизированных мышей и исследование их способности в достаточной степени переносить КЧ.

Прямое воздействие МБФ на Т-лимфоциты сенсibilизированных мышей, подобно обработке всех спленоцитов, полностью блокировало адоптивный перенос КЧ.

Таким образом, в результате проведенного исследования и сравнения двух препаратов показано, что иммуномодулирующие эффекты МБФ в большей мере, чем КД реализуются на эффекторной стадии развития реакции КЧ.

Список литературы / References

1. Албегова Д.З., Козырь Л.А., Кягова А.А., Негребетский В.В. Павлова С.И. Модифицированный биофлавоноид супрессирует реакцию контактной гиперчувствительности у мышей // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 2 (1). С. 11-14. [Albegova D.Z., Kozyr L.A., Kyagova A.A., Negrebetsky V.V., Pavlova S.I. Modified bioflavonoid suppress contact hypersensitivity in mice. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 2 (1), pp. 11-14. (In Russ.)]
2. Akiyama T., Fukami Y., Ishida J., Itoh N., Nakagawa S., Ogawara H., Shibuya M., Watanabe S. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J. Biol. Chem.*, 1987, Vol. 262, pp. 5592-5595.
3. Dagne A., Kassie F., Luo X., Melkamu T., Qian X., Schutten M.M., Upadhyaya P. Enhanced inhibition of lung adenocarcinoma by combinatorial treatment with indole-3-carbinol and silibinin in A/J mice. *Carcinogenesis*. 2011, Vol. 32, no. 4, pp. 561-567.
4. Fisher G.J., Fonseca M.J., He T., Shao Y., Verri W.A. Jr., Vicentini F.T., Xu Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway. *J. Dermatol. Sci.* 2011, Vol. 61, no. 3, pp. 162-168.
5. Kim T.Y., Kripke M.L., Ullrich S.E. Immunosuppression by factors released from UV-irradiated epidermal cells: selective effects on the generation of contact and delayed hypersensitivity after exposure to UVA or UVB radiation. *J. Invest. Dermatol.*, 1990, Vol. 94, pp. 26-32.

6. Gaspari A.A., Gober M.D. Allergic contact dermatitis. *Curr. Dir. Autoimmun*, 2008, Vol. 10, pp. 1-26.
7. Assossou O., Desvignes C., Ducluzeau M.T., Hahne M., Horand F., Kägi D., Kaiserlian D., Kehren J., Krasteva M., Nicolas J.F. Cytotoxicity is mandatory for CD8(+) T cell-mediated contact hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 189, no. 5, pp. 779-786.

Авторы:

Албегова Д.З. — к.м.н., доцент кафедры фармакологии ПФ, ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Павлова С.И. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и биохимии МФ, ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия

Лаптев О.С. — аспирант лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии, ФГУ «ФНКЦ Детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева»; ассистент кафедры организации фармацевтической деятельности, ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Негребецкий В.В. — д.х.н., профессор, заведующий кафедрой химии ЛФ, ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кягова А.А. — д.м.н., профессор, ученый секретарь кафедры физики и математики ПФ, ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Козыр Л.А. — к.б.н., доцент, заведующая учебной частью кафедры физики и математики ПФ, ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Албегова Ж.К. — д.м.н., доцент, профессор кафедры нормальной физиологии, ГБОУ ВПО «Северо-Осетинская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Владикавказ, Республика Северная Осетия, Россия

Козлов И.Г. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ПФ, ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Albegova D.Z., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Pharmacology, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Russian Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Pavlova S.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Pharmacology and Biochemistry, I.N. Uljanov Chuvash State University, Cheboksary, Russian Federation

Laptev O.S., Research Student, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Federal D. Rogachev Research & Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Management, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Russian Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Negrebetsky V.V., PhD, MD (Chemistry), Professor, Head, Department of Chemistry, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Russian Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Kyagova A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Physics and Mathematics, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Russian Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Kozyr L.A., PhD (Biology), Assistant Professor, Department of Physics and Mathematics, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Russian Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Albegova J.K., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Department of Normal Physiology, North-Ossetian State Medical Academy, Vladikavkaz, Russian Federation

Kozlov I.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pharmacology, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Russian Ministry of Healthcare, Moscow, Russian Federation

Поступила 24.03.2015
Отправлена на доработку 29.04.2015
Принята к печати 06.07.2015

Received 24.03.2015
Revision received 29.04.2015
Accepted 06.07.2015

**Материалы XV Всероссийского научного Форума
с международным участием имени академика В.И. Иоффе
ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ
1-4 июня 2015 г.**

**Тезисы, не вошедшие в Специальный выпуск журнала
«Медицинская иммунология», 2015, т. 17**

**ВРОЖДЕННЫЙ ИММУНИТЕТ ПРИ ОСТРОМ
ПАНКРЕАТИТЕ НА ФОНЕ АЛКОГОЛЬНОЙ
ИНТОКСИКАЦИИ; КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ**

**Бушмина О.Н., Локтионова А.В., Неледова Н.С.,
Литвинова Е.С.**

*Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия*

Введение. Известно, что большинство соматических заболеваний протекает гораздо тяжелее, если фоном для их развития является какая-то другая, длительно протекающая патология с формированием вторичного иммунодефицита. Одним из таких негативных сочетаний является острый деструктивный панкреатит (ОДП) и хроническая алкогольная интоксикация (ХАИ), экспериментальное и клиническое изучение иммунных нарушений при этом немногочисленно, а результаты не совсем однозначны.

Цель и задачи — оценка фармакологической эффективности различных сочетаний иммуномодуляторов, антиоксидантов и мембранопротекторов в коррекции нарушений врожденного иммунитета при экспериментальном остром деструктивном панкреатите на фоне хронической алкогольной интоксикации.

Материалы и методы. Исследования проведены на 189 крысах породы Вистар массой 150–200 г с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других целей. Хроническую алкогольную интоксикацию моделировали 30- или 60-кратным (ХАИ-30 и ХАИ-60), через 24 часа, внутривенным введением 20% раствора этанола, соответственно, в дозах 3 и 2 мл/кг. Экспериментальный ОДП вызывали, соответственно, на 25 и 55 день после первого введения этанола перивязкой протока левой и правой долей поджелудочной железы, с последующей трехкратной через 60 мин стимуляцией прозеринумом в дозе 0,2 мг/кг. Экспериментальных животных при ХАИ-30 делили на 3 равные части: в 1-й группе фармакологические препараты не вводили; 2-я группа получала гепон (5 мг/кг, внутрь, через 24 часа, №14), гипоксен (750 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, №14) и фосфоглив (800 мг/кг, внутрь в 1% крахмальной суспензии, №14); 3-я группа — глутоксим (20 мг/кг, внутримышечно, через 24 часа, №5), мексидол (50 мг/кг внутривенно, через 24 часа, №5) и гептрал (760 мг/кг, внутривенно, через 24 часа, №5). При ХАИ-60 одна часть животных получала только этанол, вторая — дополнительно глутоксим, мексидол и гептрал. Забой крыс осуществляли через 24 часа после последнего введения этанола и препаратов. Группа контроля состо-

яла из 15 здоровых животных. Фагоцитарная активность нейтрофилов периферической крови оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ) (Медведев А.Н., Чаленко В.В., 1991). Кислородзависимую активность оценивали по НСТ-тестам спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан, коэффициент опсонизации (КАн, КАо, КО) (Зинкин В.Ю. и др., 2004).

Основные результаты. У крыс с моделируемым ОДП на фоне ХАИ-30, в большей степени ХАИ-60, установлено выраженное снижение ФП, ФЧ, ИАФ и повышение НСТ-сп., НСТ-ст. о/з и н/з. Однако резервы кислородзависимой активности фагоцитов (КАо, КАн и КО) оказались сниженными. Введение комбинации препаратов гепон, гипоксен и фосфоглив крысам с ОДП в сочетании с 30-дневной ХАИ корригировало, но не до уровня нормы ФП, ФЧ, ИАФ, НСТ-тесты спонтанный и стимулированный опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, но в еще большей степени снижало функциональные резервы КАн и КО. Введение сочетания глутоксима, мексидола и гептрала нормализовало ФЧ, НСТ-ст. опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, КАн, КО и корригировало, но не до уровня нормы ФП, ИАФ, НСТ-сп., КАо. Использование глутоксима, мексидола и гептрала в условиях ОДП и ХАИ-60 корригировало фагоцитарную активность полиморфноядерных лейкоцитов, НСТ-тесты спонтанный и стимулированные опсонизированным и неопсонизированным зимозаном, КАн, но не влияло на сниженные КАо и КО.

Заключение. Таким образом, сочетание глутоксима, мексидола и гептрала эффективно корригирует нарушения функциональной активности нейтрофилов периферической крови в условиях экспериментального ОДП на фоне хронической алкогольной интоксикации.

ЗАЩИТНЫЕ ФУНКЦИИ НОВОРОЖДЕННЫХ ТЕЛЯТ

Винникова С.В.

ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургская государственная академия ветеринарной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Введение. Новорожденные телята в молозивный период часто болевают диспепсией. Заболевание характеризуется нарушением процесса пищеварения, нарушением обмена веществ, поносом, гипогаммаглобулинемией,

обезвоживанием, токсикозом, отставанием в развитии. В молозивный период новорожденные получают полноценное питание и необходимую защиту. Молозиво, полученное от коров — матерей в первые сутки после отёла, и особенно в первые часы, содержат максимальное количество иммунных глобулинов, которых у новорожденных телёта практически нет. Заболевания может быть и аутоиммунной природы. При нарушении обмена веществ у маточного поголовья, новорожденному передаются через молозиво аутоантитела и сенсибилизированные лимфоциты, повреждающие органы.

Иммуноглобулины и являются носителями антител, обеспечивающие пассивную иммунизацию новорожденных телётов.

Цель и задачи работы изучение параметров иммунологического статуса у новорожденных телётов. Показать изменение активности элементов защитной системы крови — фагоцитарная активность лейкоцитов, бактерицидная активность сыворотки крови, лимфоцитов при диспепсии.

Материалы и методы. Исследование проводилось на животноводческом комплексе ЗАО «Тайцы» Гатчинского района Ленинградской области на 10 телётах черно-пестрой породы. Фагоцитарная активность лейкоцитов составила $(50,2 \pm 2,1\%)$ по сравнению с контрольной группой $(63,5 \pm 1,70\%)$.

Бактерицидная активность сыворотки крови $(75,2 \pm 1,1\%)$ по сравнению с контролем $(93 \pm 1,1\%)$. Т-лимфоциты $(21,3 \pm 1,8\%)$ по сравнению с контролем $(28,9 \pm 1,0\%)$. В-лимфоциты $(6,0 \pm 1,0\%)$ по сравнению с контролем $(7,5 \pm 0,4\%)$. Контрольной группе животных дополнительно вводили подкожно глобулин 0,7 мл/кг.

Основные результаты. При проведении лабораторных исследований крови показатели клеточных и гуморальных факторов защиты организма: фагоцитарная активность лейкоцитов, бактерицидная активность сыворотки крови, лимфоцитов в опытной группе телётов были значительно ниже, чем у контрольной клинически здоровой группы.

Заключение. Телётов следует поить молозивом матери не позднее 1-1,5 часа после рождения. Для повышения общей резистентности и как средства заместительной терапии применять иммуноглобулины.

ИММУНОРЕАБИЛИТАЦИЯ БОЛЬНЫХ С ПЕРИОДОНТИТОМ

Голдобин Д.Д., Лунев М.А., Локтионов А.Л., Конопля А.И.

Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия

Введение. Актуальность периодонтита не вызывает сомнений, поскольку в ходе эпидемиологических исследований было установлено не только увеличение количества случаев заболевания, но и его резкое омоложение, в том числе у детей. Несомненно, наличие вирусно-бактериальных ассоциаций в полости рта обуславливает участие врожденных и адаптивных форм иммунного ответа в патогенезе заболевания, однако эти механизмы изучены недостаточно, а применение средств фармакологической иммунореабилитации таких пациентов не является обязательным и не входит в стандарт лечения периодонтита.

Цель и задачи — оценка иммунокорригирующих эффектов различных сочетаний иммуномодуляторов, антиоксидантов и мембранопротекторов при периодонтите.

Материалы и методы. Под постоянным наблюдением в клинике ЗАО ГК Медси находилось 67 пациентов обоего пола в возрасте 20-40 лет с клиническими признаками хронического периодонтита в стадии обострения: ноющая боль постоянного характера, отек переходной складки в области причинного зуба, выявление признаков его невозможного терапевтического лечения. При визуальном и инструментальном дополнительном обследовании выявлено наличие воспалительного процесса на верхушке зуба со значительным разрушением костной ткани. Все больные были разделены на 5 групп по 12-15 пациентов в каждой: 1-я группа получала стандартное лечение (удаление причинного зуба, цифран, бифидорм, супрастин), больные 2-й группы дополнительно получали гепон (10 мг, перорально, через 24 часа, №30), 3-я — сочетание гепона, эссенциале форте Н (по 2 капс., перорально, через 6 часов, №90) и каскатола (1 др., перорально, через 24 часа, №30), 4-я — вобэнзим (3 таб., перорально, через 6 часов, №90), 5-я — вобэнзим, эссенциале форте Н и каскатол. Контрольная группа включала 15 здоровых доноров того же возраста. До и после лечения в плазме крови и слюне при помощи наборов для ИФА определяли концентрацию цитокинов (TNF, IL-1, IL-8, IL-4, IL-10, IL-2), рецепторного антагониста IL-1 (РАИЛ), компонентов системы комплемента (C3, C4, C5) и ее регуляторов (C1-ингибитор и фактор Н).

Основные результаты. До начала лечения в плазме крови установлено повышение содержания TNF, IL-1 β , IL-8, C3-, C4-, C5-компонентов системы комплемента и ее регуляторов (C1-ингибитора и фактора Н), снижение уровня IL-4 и IL-10 при нормальной концентрации РАИЛ. В слюне отмечалось более существенное повышение содержания TNF, IL-1 β , IL-8, РАИЛ и нормальный уровень IL-4 и IL-10. Стандартное лечение на системном уровне корригировало, но не до показателей доноров, концентрацию TNF, IL-1 β , IL-2, C3-компонента комплемента, еще больше повышало содержание IL-10 и РАИЛ, а на местном уровне — корригировало концентрацию TNF, IL-1 β , IL-8, IL-2, повышало уровень IL-10 и РАИЛ, не влияя на показатели системы комплемента. Дополнительное введение в схему лечения гепона или вобэнзима в равной степени корригировало показатели системы цитокинов и комплемента. Применение гепона, эссенциале форте Н и каскатола системно и локально, соответственно, нормализовало 8,3% и 16,6% показателей и корригировало 75% и 67%. Введение комбинации вобэнзима, эссенциале форте Н и каскатола нормализовало и корригировало 66,7% и 33,3% показателей на системном уровне, на местном — 41,7% и 58,3%.

Заключение. У больных с периодонтитом имеются системные и местные изменения показателей иммунного статуса. По возрастанию степени корригирующих эффектов на иммунные нарушения дополнительно введенные в комплексное лечение периодонтита препараты расположились в следующей последовательности: гепон → вобэнзим → гепон + эссенциале форте Н + каскатол → вобэнзим + эссенциале форте Н + каскатол.

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ ЛИМФОЦИТОВ ПРИ РЕАГИНОВОЙ АЛЛЕРГИИ У ДЕТЕЙ

Дементьева Е.А., Гурина О.П., Блинов А.Е.,
Варламова О.Н., Тимохина В.И.

ГБОУ ВПО СПбГПМУ, Санкт Петербург, Россия

В патогенезе аллергического воспаления ключевую роль играют лимфоциты — основные эффекторы иммунной системы. Особенностью иммунного механизма развития atopической реакции является повышенная склонность к образованию специфических IgE-антител в ответ на аллергены. При этом Т-хелперы, секретирующие IL-4, 5, 6, 10, 13, 31, переключают в В-лимфоцитах синтез антител с IgG на IgE, тем самым способствуют развитию у atopиков частых ОРВИ, пиодермий, хронических отитов, гайморитов и других инфекционных заболеваний.

Цель работы: исследование субпопуляций лимфоцитов при реактивной бронхитальной астме (БА) и atopическом дерматите (АД) у детей.

Материалы и методы: обследовано 180 детей с АД и 112 детей с БА в возрасте от 1 года до 17 лет. Иммунофенотипирование лимфоцитов выполнялось методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови и «безотмывочной» технологии (проточный цитометр Epics XL, Beckman Coulter, США). Для оценки распределения лимфоцитов по различным популяциям клетки окрашивались трехцветными комбинациями моноклональных антител, конъюгированных с флуоресцентными красителями FITC/PE/PC5: CD45/CD3/CD19, CD45/CD3/CD4, CD45/CD3/CD8/, CD45/CD3/CD(16+56), CD45/CD3/HLA DR (Beckman Coulter, США). Популяции клеток выделялись при помощи гетерогенного гейтирования. Абсолютные значения лимфоцитов подсчитывались с использованием референсных частиц. Статистическая обработка полученных результатов — программа Microsoft Excel.

Результаты и обсуждение

Atopический характер заболеваний у данной группы пациентов подтвержден исследованием концентрации общего IgE в сыворотке крови.

У детей с АД выявлены абсолютная и относительная В-лимфоцитопения (у 13% и 17% обследованных детей соответственно). Относительный Т-лимфоцитоз обнаружен у 27% детей с АД за счет повышения относительного содержания CD3⁺/CD4⁺ Т-хелперов у 20% пациентов и CD3⁺/CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов у 17% обследованных. У 20% детей, страдающих АД, отмечается снижение относительного количества NK-клеток (CD3/CD(16+56)⁺), а также низкий абсолютный и относительный уровень активированных Т-лимфоцитов CD3⁺/HLA DR⁺ (у 30% и 31% обследованных). Иммунорегуляторный индекс при этом у равного количества детей (27%) имеет повышенное или сниженное значение.

БА у детей протекает на фоне абсолютной и относительной В-лимфоцитопении (у 33% и 25% детей соответственно) в сочетании с относительным Т-лимфоцитозом (в 33% случаев) за счет высокого относительного содержания CD3⁺/CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов (у 44% обследованных). У 22% детей обнаружено снижение относительного количества CD3/CD(16+56)⁺ NK-клеток. У 44% пациентов выявлено повышение относительного содержания CD3⁺/CD(16+56)⁺ NKT-лимфоцитов, которые обладают способностью секретировать цитокины, стимулирующие эффекторы Th2-ответа. Так же как и при

АД отмечается снижение абсолютного и относительно уровней активированных Т-клеток CD3⁺/HLA DR⁺ (у 56% и 50% обследованных). Иммунорегуляторный индекс у 56% пациентов ниже нижней границы возрастной нормы.

Полученные результаты свидетельствуют об иммунной компрометации больных atopическими заболеваниями. Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов у детей с реактивными аллергическими заболеваниями необходимо для проведения обоснованной индивидуальной патогенетической иммунокоррекции с целью повышения эффективности базовой терапии, снижения тяжести заболевания, частоты обострений, а также снижения частоты и тяжести сопутствующей патологии.

ИММУНОМОДУЛИРУЮЩИЕ, ЭНДОТЕЛИО- И КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ СТАТИНОВ И L-НОРВАЛИНА В УСЛОВИЯХ ЭНДОТОКСИН-ИНДУЦИРОВАННОЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСФУНКЦИИ

Ивлицкая И.Л., Покровский М.В., Провоторов В.Я.,
Покровская Т.Г.

Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия

Введение. Значительная роль сосудистого эндотелия в патогенезе многих соматических заболеваний, а также его тесная взаимосвязь с одной из важнейших систем регуляции гомеостаза — иммунной, не вызывает сомнений. Особую актуальность изучение эндотелиальной дисфункции, ее взаимосвязи с факторами врожденного иммунитета и способов коррекции имеющихся нарушений в перечисленных системах приобретает при инфекционной патологии, обусловленной инфекционными агентами и/или их токсинами.

Цель и задачи — оценить корректирующие эффекты статинов и L-норвалина на показатели врожденного иммунитета, сосудистые реакции и сократительную функцию миокарда в условиях экспериментальной модели эндотоксин-индуцированной эндотелиальной дисфункции (ЭИЭД).

Материалы и методы. Эксперимент проведен на 150 крысах линии Вистар. Моделирование ЭИЭД у крыс производили подкожным введением 0,1 мл свежей взвеси *Staphylococcus aureus* (штамм 603, 10⁶/мл микробных тел) с последующим 10-минутным компрессионным массажем места инъекции. Фагоцитарная активность нейтрофилов оценивалась по фагоцитарному показателю (ФП), фагоцитарному числу (ФЧ) и индексу активности фагоцитоза (ИАФ) (Медведев А.Н., Чаленко В.В., 1991). Кислородзависимая активность — по НСТ-тестам спонтанному (НСТ-сп.) и стимулированному опсонизированным и неопсонизированным зимозаном (НСТ-ст. н/з, НСТ-ст. о/з), коэффициентам активации на опсонизированный и неопсонизированный зимозан, коэффициент опсонизации (Кан, Као, Ко) (Зинкин В.Ю. и др., 2004). Сосудистые реакции оценивали в пробах с ацетилхолином (АХ) в дозе 40 мкг/кг и с нитропруссидом натрия (НП) в дозе 30 мкг/кг. Коэффициент эндотелиальной дисфункции (КЭД) вычисляли как отношение площадей треугольников восстановления АД в пробах с ацетилхолином и нитропруссидом. Изменение функциональных возможностей миокарда — левожелудочкового давления (ЛЖД), максимальной скорости повышения и снижения

ЛЖД (СС и СР), ЧСС и интенсивность функционирования структур (ИФС) исследовали в пробах на адрено-реактивность, нагрузку сопротивлением и реоксигенацию. Все животные были разделены на группы: 1 (15 крыс) – интактные животные; 2 (18 крыс) – животные с ЭИЭД без препаратов; 3 и 4 (19 и 20 крыс соответственно) – с ЭИЭД, получавшие симвастилин или розувастатин (0,05 мг/кг, внутривенно, через 24 часа, №7); 5-я группа (20 крыс) – ЭИЭД, получавшие L-норвалин (10 мг/кг, внутривенно, через 24 часа, №7), в 6 и 7 группах вводили комбинации статинов и L-норвалина в указанных дозировках.

Основные результаты. У крыс с ЭИЭД снижались показатели ФП, ФЧ и повышалась метаболическая активность нейтрофилов периферической крови в спонтанном и стимулированном НСТ-тестах, кроме того, снижались САД, ДАД и увеличивалась ЧСС и, как следствие, КЭД. При исследовании сократительной функции миокарда в условиях ЭИЭД повышались СС и СР, не изменялись ЛЖД, ЧСС и ИФС, однако, при проведении функциональных проб отмечалось угнетение миокардиальных сократительных резервов. Внутривенное введение розувастатина или L-норвалина, по сравнению с симвастином, эффективнее корректировало показатели фагоцитоза, НСТ-сп., НТС-ст н/з и о/з, сосудистые реакции и сократительную функцию миокарда животных с ЭИЭД. Комбинированное использование L-норвалина и розувастатина по сравнению с сочетанием L-норвалина и симвастина обладало более выраженным иммуномодулирующим, эндотелио- и кардиопротективным действием при стафилококковой модели ЭИЭД.

Заключение. Таким образом, ЭИЭД характеризуется выраженными изменениями соотношений фагоцитарной, метаболической активности нейтрофилов, сосудистых реакций и сократительной активности миокарда, увеличением коэффициента эндотелиальной дисфункции. Применение розувастатина, L-норвалина и их сочетаний оказалось эффективнее, чем симвастин и его сочетание с L-норвалином в коррекции нарушенных показателей при моделировании ЭИЭД.

СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ АНТИТЕЛ К ГИСТОНЫМ БЕЛКАМ И ОСНОВНОМУ БЕЛКУ МИЕЛИНА В КРОВИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ РАССЕЯННЫМ СКЛЕРОЗОМ

Кляус Н.А., Седых С.Е., Невинский Г.А.

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, Россия

Введение. Выявление специфических аутоантител (ААТ) на ранних стадиях развития аутоиммунных заболеваний не всегда обладает достаточной диагностической точностью в связи с тем, что возможна их продукция и у людей без аутоиммунных заболеваний. В последние годы обнаружено, что ААТ могут обладать каталитической активностью, оценка уровня которой может рассматриваться как перспективный метод диагностики аутоиммунных заболеваний.

Цель и задачи: анализ относительного содержания ААТ к ОБМ и ГБ в крови больных РС и здоровых доноров, получение поликлональных ААТ из крови исследу-

емых лиц и исследование относительной активности гидролиза ОБМ и ГБ абзимами.

Материал и методы. Исследованы препараты плазмы крови 6 пациентов с подтвержденным ранее диагнозом РС и 6 здоровых доноров. Для определения содержания АТ к ОБМ и ГБ использовался метод прямого иммуноферментного анализа. Методом аффинной хроматографии на Protein G-Sepharose у исследованных лиц были получены IgG, из которых выделены фракции IgG, обладающие высоким сродством к ОБМ и ГБ, используя гистон-сефарозу и ОБМ-сефарозу. Полученными абзимами проведен гидролиз ОБМ и ГБ, активность которого оценивалась при помощи определения белковых фракций на электрофорезе. Для расчета достоверности различий использовались методы непараметрической статистики.

Результаты. Содержание АТ к ГБ у здоровых доноров – $0,59 \pm 0,09 A_{450}$, в сравнении с пациентами с РС – $0,77 \pm 0,10 A_{450}$ ($p < 0,05$). Содержание АТ к ОБМ у группы исследованных здоровых доноров $0,56 \pm 0,19 A_{450}$ значительно не отличалось в сравнении с больными РС – $0,6 \pm 0,12 A_{450}$, ($p < 0,05$). Выделенные из плазмы крови здоровых доноров АТ не продемонстрировали значимой гидролитической активности. Фракции IgG из плазмы крови больных РС, связывающие ГБ, в 28 раз более активны в гидролизе ГБ, чем ОБМ. Фракции, не связывающие ГБ, но имеющие сродство к ОБМ в 62 раза более активны в гидролизе ГБ, чем ОБМ. Фракции IgG из плазмы крови больных РС, связывающие ОБМ, в 1,3 раза более активны в гидролизе ОБМ, чем ГБ. Фракции, не связывающие ОБМ, но имеющие сродство к гистон-сефарозе более активны как в гидролизе ОБМ, так и ГБ; гидролиз ГБ этими фракциями в 1,1-2,4 раза более эффективен, чем ОБМ.

Заключение. Впервые показано, что плазма крови больных РС и здоровых доноров содержит АТ к ГБ и ОБМ, обладающие каталитической активностью. Выделенные препараты АТ из крови больных РС, но не здоровых доноров, эффективно гидролизуют ГБ. АТ, взаимодействующие с иммобилизованными ОБМ и ГБ, гидролизуют как ОБМ, так и ГБ. Эффективность гидролиза ГБ существенно выше, чем ОБМ.

ЦИТОКИНОВЫЙ СПЕКТР ПЛАЗМЫ КРОВИ БОЛЬНЫХ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ ДО И ПОСЛЕ СТАНДАРТНОГО ЛЕЧЕНИЯ

Поляков Д.В., Солошенко В.В., Конопля Е.Н., Локтионов А.Л.

Курский государственный медицинский университет, Курск, Россия

Введение. Цитокины являются одной из наиболее мощных систем регуляции и интеграции врожденных и адаптивных форм иммунного ответа. Кроме того, исследование концентрации цитокинов в плазме крови больных с различной соматической патологией позволяет предполагать наличие новых механизмов развития болезни и разрабатывать в этой связи эффективные фармакологические и нефармакологические способы лечения. Одним из актуальных заболеваний, характеризующихся высокими показателями летальности, несмотря на имеющиеся методы диагностики, а также появление новых ле-

карственных средств с антибактериальной активностью, является внебольничная пневмония (ВП), патогенез которой все еще недостаточно изучен (Караулов А.В., Калужин О.В., 2013).

Цель и задачи — оценка системы цитокинов до и после стандартного лечения у больных внебольничной пневмонией средней степени тяжести.

Материалы и методы. Под постоянным наблюдением в ОБУЗ «Городская клиническая больница №6» г. Курска находился 51 пациент с ВП средней степени тяжести. Средний возраст больных составлял $46,2 \pm 7,4$. Все пациенты подвергались комплексному клиническому и лабораторно-инструментальному обследованию: проводились сбор жалоб и анамнеза, физикальное обследование, электрокардиография, рентгенография грудной клетки, клинический и биохимический анализы крови, бактериологический анализ мокроты. На момент госпитализации больные, в подавляющем большинстве, предъявляли жалобы на сухой или влажный кашель с мокротой, повышение температуры тела до 38–39 °С на фоне прогрессирующей слабости, сонливости, снижения аппетита. У всех вошедших в исследование больных диагноз пневмонии был подтвержден наличием инфильтративных изменений при рентгенографии органов грудной клетки. Всем пациентам проводилось лечение в строгом соответствии с национальными рекомендациями (Российское респираторное общество/МАКМАХ, 2010), которое включало антибактериальные препараты, муколитики, инфузионную дезинтоксикационную и симптоматическую терапию. При помощи наборов для ИФА в плазме крови больных ВП до и после различных методов лечения оценивали концентрацию провоспалительных (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18), противовоспалительного (IL-4) цитокинов, GM-КСФ, IL-2, IFN γ , рецепторного антагониста к IL-1 (РАИЛ). Контрольная группа состояла из 12 здоровых доноров того же возраста.

Результаты и обсуждение. До лечения у больных ВП в плазме крови установлено повышение концентрации провоспалительных (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18), противовоспалительного (IL-4) цитокинов, GM-КСФ, IL-2, IFN γ , снижение концентрации РАИЛ. Стандартное лечение больных ВП корригировало содержание TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, GM-КСФ, РАИЛ, в большей степени повышало концентрацию IL-4 и IL-10.

Заключение. Полученные результаты позволяют констатировать провоспалительную направленность изменений в системе цитокинов, о чем свидетельствует повышение концентрации основных медиаторов воспалительной реакции, инициирующих этот процесс (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-18), обеспечивающих мобилизацию гранулоцитарного и моноцитарно-макрофагального звеньев (IL-8, IL-18, GM-КСФ), регуляторных факторов (IL-2, IFN γ). Отмечается компенсаторное повышение содержания IL-4, направленное на контроль генерализации воспалительной реакции. Лечение больных ВП в соответствии со стандартом не позволяет нормализовать большинство нарушенных показателей цитокинового статуса, что обосновывает включение в комплексное лечение ВП различных методов фармакологической и нефармакологической иммунореабилитации.

ИММУННЫЙ ГОМЕОСТАЗ И ЭНДОТЕЛИАЛЬНАЯ ДИСФУНКЦИЯ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ ПАНКРЕАТОБИЛИАРНОЙ ОБЛАСТИ; КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ

Рагулина В.А.

Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия

Введение. Различные виды патологии, в том числе панкреатобилиарной области, сопряжены с нарушениями иммунного гомеостаза и эндотелиальной дисфункцией. В связи с тем, что недостаточно изучены взаимосвязь возникновения и развития эндотелиальной дисфункции и иммунных нарушений, особого внимания заслуживают исследования, в которых изучаются механизмы регулирования иммунного гомеостаза, играющего немаловажную роль в патогенезе эндотелиальной дисфункции.

Цель и задачи — оценить иммунные нарушения, степень эндотелиальной дисфункции и эффективность их коррекции производными 3-гидроксипиридина (3-ГП) в условиях экспериментальной патологии органов панкреатобилиарной области.

Материалы и методы. Эксперименты проведены на 84 здоровых крысах Вистар, массой 180–200 г с соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных. Острое токсическое поражение печени (ОТПП) моделировали внутрибрюшинным введением 3 мл/кг четыреххлористого углерода (ЧХУ) в виде 50% раствора в оливковом масле, трехкратно, через 24 часа или внутривенным введением индометацина (трехкратно, с интервалом 24 ч., по 5 мг/кг). Острый деструктивный панкреатит (ОДП) моделировали по R.N. Wang. Производные 3-ГП вводили пятикратно, через 24 часа, внутрибрюшинно в экспериментально подобранных дозах: соединение ХС-9 — 35 мг/кг, «Этоксидол» и «Мексидол» по 50 мг/кг. Степень эндотелиальной дисфункции у экспериментальных животных, а также степень ее коррекции исследуемыми препаратами оценивали по расчетному коэффициенту эндотелиальной дисфункции (КЭД). Выраженность гуморального иммунного ответа (ГИО) на эритроциты барана (ЭБ) оценивали путем определения в селезенке числа иммунных АОК (Зауэр Х., 1989). Формирование реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) индуцировали ЭБ (Федосеева Т.В. и др., 1993). Группа контроля состояла из 15 здоровых животных.

Основные результаты. У животных с ОТПП, вызванным введением ЧХУ, наблюдалась стимуляция развития как ГИО, так и ГЗТ. При ОТПП, вызванном введением ЧХУ, применение «Мексидола» корригировало, но не до контрольных значений, а «Этоксидола» и соединения ХС-9 — нормализовало количество иммунных АОК на ЭБ в селезенке отравленных животных и показатели, характеризующие ГЗТ. У крыс с ОТПП, вызванным введением индометацина, в большей степени у животных с ОДП, наблюдалось угнетение ГИО и ГЗТ на ЭБ. При острой токсической гепатопатии, вызванной поступлением в организм индометацина, применение «Мексидола» не влияло, соединения ХС-9 корригировало, а «Этоксидола» нормализовало показатели иммунной реактивности. В условиях ОДП «Мексидол» корригировал, но не до показателей здоровых животных, а «Этоксидол» и соеди-

нение ХС-9 нормализовали количество иммунных АОК на ЭБ в селезенке экспериментальных животных. При этом, все производные 3-ГП нормализовали развитие ГЗТ на ЭБ. Результаты функциональных проб на эндотелийзависимое и эндотелийнезависимое расслабление сосудов у животных с гепатобилиарной патологией на фоне лечения мексидолом, этоксидолом и ХС-9 позволили установить, что исследуемые препараты снижали КЭД. Максимальной эффективностью при всех видах патологии обладало соединение ХС-9, использование которого позволило нормализовать КЭД.

Заключение. Результаты указывают на выраженные иммуномодулирующие и эндотелиопротективные свойства производных 3-ГП (в большей степени «Этоксидола» и соединения ХС-9) в условиях токсического поражения печени, вызванного различными по природе и механизму действия гепатотропными токсикантами и экспериментального ОДП. Эффекты производных 3-ГП связаны с влиянием на выработку гуморальных факторов как иммунными, так и клетками различных органов и тканей (в первую очередь, гепатоцитами) при измененной иммунной реактивности в условиях патологии, характеризующейся нарушением процессов перекисного окисления липидов и, как следствие, нарушением целостности клеточных мембран, развитием эндотелиальной дисфункции.

КОРРЕКЦИЯ НАРУШЕНИЙ В СИСТЕМЕ КОМПЛЕМЕНТА У ПАЦИЕНТОВ С ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИЕЙ

Солошенко В.В., Поляков Д.В., Конопля А.И.

*Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия*

Введение. Факторы врожденного иммунитета, в том числе включающие систему комплемента, являются системой «быстрого реагирования» при развитии инфекционного процесса, одним из которых является внебольничная пневмония (ВП), представляющая объективные трудности как в диагностике, так и в определении обоснованной лечебной тактики. Основная роль системы комплемента при попадании в организм различных чужеродных агентов заключается в каскадной активации ее компонентов с последовательным образованием ферментативно активных форм путем расщепления молекул или объединением нескольких активных субъединиц в один мембраноатакующий комплекс, поражающий бактериальную клетку (Хаитов Р.М. и др., 2010). При этом нарушения в системе комплемента могут негативно сказываться на течении инфекционного процесса, приводя к его хронизации или генерализации.

Цель и задачи — изучение состояния системы комплемента и определение корректирующих эффектов дерината, эссенциале форте Н и мексидола у больных внебольничной пневмонией.

Материалы и методы. Под постоянным наблюдением в МБУЗ «Городская клиническая больница №2» г. Белгорода находилось 42 пациента с ВП средней степени тяжести, средний возраст которых составлял $45,2 \pm 6,9$. Все пациенты подвергались комплексному клиническому и лабораторно-инструментальному обследованию, кроме того, лечение проводилось в строгом соответствии с национальными рекомендациями (Российское респиратор-

ное общество/МАКМАХ, 2010), которое включало антибактериальные препараты, муколитики, инфузионную дезинтоксикационную и симптоматическую терапию. У половины больных исследуемой группы на основании информированного согласия дополнительно применяли сочетание деринат (1,5% - 5,0, внутримышечно, через 24 часа, №10), эссенциале форте Н (по 2 капс., перорально, через 6 часов, №42), мексидол (200 мг, внутривенно, через 24 часа, №10). При помощи наборов для ИФА в плазме крови больных ВП до и после различных методов лечения оценивали концентрацию компонентов системы комплемента (C_3 , C_{3a} , C_4 , C_5 , C_{5a}) и ее регуляторов (фактора Н и С1-ингибитора). Контрольная группа состояла из 12 здоровых доноров того же возраста.

Основные результаты. У больных ВП до начала лечения в плазме крови установлено повышение концентрации C_{5a} -компонента системы комплемента, С1-ингибитора, снижение содержания C_3 , C_{3a} , C_4 , C_5 -компонентов комплемента, при нормальном уровне С1-ингибитора и фактора Н. Лечение больных ВП по стандарту корректировало содержание C_4 , C_{5a} -компонентов комплемента. Включение в комплексное лечение комбинации деринат, эссенциале форте Н и мексидола дополнительно нормализовало содержание C_{3a} -компонента системы комплемента, в большей степени корректировало концентрацию C_3 , C_5 -компонентов комплемента.

Заключение. Таким образом, у больных ВП наблюдается снижение концентрации в плазме крови большинства исследованных компонентов системы комплемента, что можно связать с инфекционной природой самого заболевания, поскольку в основе его патогенеза лежит воспалительная реакция. Лечение согласно существующим рекомендациям включает препараты, обладающие только антибактериальной и противовоспалительной активностью, в то время как лабораторные изменения, определяемые у больных с ВП, требуют дополнительного включения в схему лечения препаратов, обладающих и иммуномодулирующей, антиоксидантной и мембранопротекторной активностью. В этой связи стандартное лечение только корректировало отдельные показатели системы комплемента. Более эффективно в коррекции нарушенных показателей оказалось сочетание дерината, эссенциале форте Н и мексидола, что обосновывает их включение в комплексное лечение больных ВП.

АНАЛИЗ БИОХИМИЧЕСКОЙ И БИОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES*

Старикова Э.А., Соколов А.В., Власенко А.Ю., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С.

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение "Институт экспериментальной медицины"

Введение. Метаболизм аргинина играет важную роль в регуляции функций эукариотических клеток. Многие патогены используют метаболические пути аргинина организма хозяина для успешной инвазии и диссеминации (Priyanka Das, 2010). Одним из бактериальных ферментов, метаболизирующих аргинин, является аргининдеиминаза (Manuel Zuniga, 2002). Показано, что аргининдеиминаза патогенных микроорганизмов *M. arginini* и *P. aeruginosa* подавляют пролиферативную активность

эукариотических клеток, а также ингибируют процесс ангиогенеза (I.-S. Park, 2003; R.H. Kim, 2009). Пиогенный стрептококк относится к патогенам, которые вызывают тяжелые инфекционные заболевания у человека, часто приводящие к развитию осложнений (Cunningham M.W., 2000). Роль аргининдеиминазы в патогенезе стрептококковой инфекции остается слабо изученной. Цель данного исследования состояла в выделении из продуктов разрушения пиогенного стрептококка и последующем проведении анализа биохимической и биологической активности АД *S. pyogenes*, серологической группы А, тип M22, штамм AL168.

Материалы и методы. В экспериментах использовали супернатант разрушенных ультразвуком стрептококковых клеток. Для выделения аргининдеиминазы последовательно использовали ионообменную хроматографию на UNO-sphere Q, гель-фильтрацию на Sephacryl S-200 HR и аффинную хроматографию на аргинин-сефарозе. Отбирали фракции, которые обладали способностью снижать концентрацию гуанидиновых групп аргинина и вызывали подавление пролиферации эндотелиальных клеток линии EA.hy926 не менее чем на 50% при разведении фракции в 25 раз. Идентификацию аргининдеиминазы проводили с помощью масс-спектрометрии фрагментов трипсинолиза, полученные пептидные фингерпринты анализировали on line при помощи программы MASCOT (<http://www.matrixscience.com>). Для определения гуанидиновых групп аргинина использовали модифицированную реакцию Сукагучи. Пролиферативную активность клеток оценивали по их распределению по фазам клеточного цикла, а также с использованием спектрофотометрического метода (путем окрашивания монослоя красителем кристаллическим фиолетовым). Статистический анализ данных проводили с использованием t-критерия Стьюдента. Результаты. При SDS-электрофорезе в ПААГ во фракциях с антипролиферативной активностью был выявлен белок с М около 40 kDa, который был подвергнут масс-спектрометрическому анализу фрагментов трипсинолиза. Были найдены от 9 до 10 пептидов, соответствующих аргининдеиминазы из различных штаммов *S. pyogenes* серотипов M1, M2, M3, M4, M5, M6, M12, M18, M28, M49. Выделенный фермент отличался высокой процессивностью (число оборотов 35/с) и оптимальным рН – 6,8 – наиболее близким к рН плазмы крови (7,4). Его удельная активность составляла 46,7 мкмоль Агт/мин/мг белка. Изучение биологической активности аргининдеиминазы показало достоверное дозозависимое снижение пролиферативной активности эндотелиальных клеток до 60% (3 мкг аргининдеиминазы/мл), что соответствовало биологической активности супернатанта разрушенных ультразвуком стрептококков при разведении 1/50. При добавлении в культуральную среду экзогенного L-Arg в нарастающей концентрации способность фермента подавлять пролиферацию клеток частично снижалась, но полного восстановления пролиферативной активности клеток до уровня контроля не происходило, предположительно из-за появления в среде токсичного метаболита L-Arg – аммиака.

Заключение. Анализ биохимической и биологической активности аргининдеиминазы *S. pyogenes*, M22 показал, что фермент обладает активностью, сравнимой с изученными ферментами других микроорганизмов, и может играть важную роль в патогенезе стрептококковой инфекции.

ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО И ОКСИДАНТНОГО СТАТУСА ПРИ ДИАГНОСТИКЕ ОСТРОГО ПАНКРЕАТИТА БИЛИАРНОЙ И НЕБИЛИАРНОЙ ЭТИОЛОГИИ

Суняйкина О.А., Конопля А.И., Локтионов А.Л., Быстрова Н.А., Микаелян П.К., Азарова Ю.Э.

Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия

Введение. Использование общепринятых лабораторных методов определения тяжести течения и эффективности лечения многих заболеваний не приносит нужного результата и в основном играет роль скринингового исследования. В этой связи весьма перспективен дифференцированный подход построения диагностического алгоритма в зависимости от этиологии острого панкреатита (ОП), в частности билиарной или небилиарной (ОБП и ОНБП) этиологии.

Цель и задачи – разработка дифференцированных подходов к лабораторной диагностике острого отечного и деструктивного билиарного и небилиарного панкреатита.

Материалы и методы. Под постоянным наблюдением в течение 6 лет в хирургическом отделении ОБУЗ «Курская городская клиническая больница №4» находилось 282 пациента в возрасте от 24 до 70 лет с различными формами ОБП и ОНБП, из которых 120 больных с отечной формой ОП (из них 62 с ОБП не оперированных и оперированных по поводу желчнокаменной болезни и ее осложнений и 58 с ОНБП) и 65 пациентов с деструктивным ОП (25 – с ОБП и 40 – с ОНБП) с прогнозируемым легким течением (менее 6 баллов по шкале APACHEII), в хирургическом лечении которых были исключительно использованы малоинвазивные методики. Уровень в сыворотке крови TNF, IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-18, G-КСФ, IFN α , IFN γ , IL-4, IL-10, РАИЛ, C₃, C₄-компонентов комплемента, фактора Н и С1-ингибитора, определяли с помощью наборов реагентов методом твердофазного иммуноферментного анализа. Выраженность перекисного окисления липидов оценивали по концентрации ацилгидроперекисей (АГП) и малонового диальдегида (МДА). Кроме этого, определяли активность каталазы и супероксиддисмутазы (СОД), общую антиокислительную активность (ОАА), содержание стабильных метаболитов оксида азота (СМ_{NO}). Активность и интенсивность фагоцитоза нейтрофилов, выделенных из периферической крови, оценивали по фагоцитарному индексу, фагоцитарному числу и индексу активности фагоцитоза. Активность кислородзависимых систем нейтрофилов оценивали по реакции восстановления нитросинеготетразолия, спонтанного и стимулированного зимозаном с расчетом функционального резерва нейтрофилов. В полученных по методу E. Beutler эритроцитах определяли уровень АГП, МДА, СМ_{NO}, ОАА, активность СОД и каталазы. Кроме этого, оценивали общую сорбционную способность эритроцитов и сорбционную емкость их гликокаликса. Мембраны эритроцитов получали методом G. T. Dodge, электрофорез мембранных белков проводили по методу U.K. Laemmli. Белки окрашивали Кумасиголубым R-250 по модифицированной методике G. Fairbanks. Липиды мембран выделяли методом тонкослойной хроматографии.

Основные результаты. При отечной форме ОП установлены максимально измененные до стандартного лечения показатели иммунного статуса у больных с ОНБП

и с ОБП, оперированных по поводу желчнокаменной болезни и ее осложнений. При этом с прогностической целью предложено использование определения в сыворотке крови концентрации TNF, IL-2, IL-4, IL-10, C3-компонента комплемента. Критерием деструктивных форм ОП являются изменения оксидантных и антиоксидантных показателей, содержание белков и липидов в мембранах эритроцитов. Лабораторными дифференциально-диагностическими признаками деструктивных ОБП и ОНБП являются разнонаправленные изменения эритроцитарных сорбционных маркеров эритроцитов, IL-2, ОАА, IL-6, IL-10, C3-компонент комплемента, мембранная эритроцитарная представительность холестерина, фосфатидилэтаноламина, лизофосфатидилхолина, фосфатидилинозитола, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы, глутатион-S-трансферазы, эфиров холестерина, моно- и диглициридов.

Заключение. Предложены лабораторные иммунные и метаболические показатели компонентов периферической крови для дифференциально-диагностических критериев острого отечного и деструктивного билиарного и небилиарного панкреатита.

ХРОНИЧЕСКАЯ ИШЕМИЯ ГОЛОВНОГО МОЗГА: ИММУНОМЕТАБОЛИЧЕСКИЕ НАРУШЕНИЯ, КОРРЕКЦИЯ

Шульгина А.А.

*Курский государственный медицинский университет,
Курск, Россия*

Введение. Одно из центральных мест в изучении цереброваскулярной патологии занимает проблема лечения больных с хронической ишемией головного мозга (ХИМ). Иммунное воспаление и нарушение липидного обмена приводят к необратимому повреждению фосфолипидных мембранных комплексов и деструктивному процессу в нейроглии, что является одной из причин клинических проявлений ХИМ. Это диктует необходимость оптимизации лечения таких больных применением наиболее эффективных сочетаний ноотропных и антиоксидантных препаратов.

Цель и задачи — установление иммунных и метаболических нарушений и выявление эффективности использования фармакотерапии, включающей комбинацию препаратов ноотропного и антиоксидантного действия у пациентов с ХИМ.

Материалы и методы. Анализ подвергнуты результаты лечения 57 пациентов со II стадией ХИМ на фоне гипертонической болезни II стадии, которые были поделены на 3 группы, получавшие комплексную базовую и дополнительную терапию парными сочетаниями ноотропных и антиоксидантных препаратов. Иммунные нарушения оценивали по уровню в плазме крови цитокинов (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, IL-4, IL-10, рецепторного антагониста IL-1 (РАИЛ), IFN γ , IL-2, IL-17), компонентов комплемента (C₃, C_{3a}, C₄, C₅, C_{5a}), ее ингибиторов (фактора Н, С1-ингибитора), иммуноглобулинов классов М, G,

А. Метаболические изменения устанавливали по концентрации ацилгидроперекисей АГП), малонового диальдегида (МДА), церулоплазмينا (ЦП), С-реактивного белка (СРБ), неоптерина, стабильных метаболитов оксида азота (CMNO), активности каталазы, супероксиддисмутазы (СОД), общей антиокислительной активности (ОАА) сыворотки крови.

Основные результаты. До начала лечения в плазме крови больных ХИМ установлено значительное повышение концентрации цитокинов: IFN γ , IL-2, IL-17, провоспалительных (TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18) с одновременным повышением противовоспалительных IL-4 и IL-10 при неизменном содержании РАИЛ. Также выявлено повышение уровня C₅, C_{3a}, снижение содержания C₃, C₄-компонентов системы комплемента и всех исследованных классов иммуноглобулинов (IgM, IgG, IgA) при неизменной концентрации, по сравнению с контрольной группой, фактора Н, С1-ингибитора и C_{3a} компонента, отмечено повышение концентрации CMNO, СРБ, МДА, АГП, значительное снижение активности СОД и каталазы, ОАА, уровня ЦП, увеличение содержания неоптерина. Введение в схему лечения церебролизина и мексидола нормализовало уровень C₃, C₄-компонентов комплемента и IgG, ОАА, МДА, активность каталазы, снижало концентрацию TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, IFN γ , IL-2, IL-17, C₅-компонента комплемента, активность СОД, уровень АГП, неоптерина и СРБ, повышало содержание IgA, IL-10 и РАИЛ. При использовании эмоксипина и пирацетама отмечена нормализация уровня IL-17, C₃, C₄-компонентов комплемента и IgG, МДА, СРБ, ОАА и активность СОД, коррекция содержания TNF, IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18, IFN γ , IL-2, C₅, C_{3a}-компонентов комплемента, IgA и М, АГП, неоптерина и CMNO, ЦП, повышение концентрации противовоспалительных цитокинов IL-4, IL-10, РАИЛ, С1-ингибитора и фактора Н, активность каталазы. Аналогичные, но более выраженные корригирующие эффекты на иммунные и метаболические показатели, оказывала комбинация актовегин и церетон.

Заключение. На основании исследования пациентов с ХИМ при поступлении в клинику изменения иммунометаболических показателей прямо или косвенно свидетельствует о наличии иммунного воспаления, дисфункции эндотелия, «оксидантного стресса», снижении антиоксидантной защиты. Наибольшей эффективностью обладает сочетание актовегин и церетон, наименьшей — применение церебролизина и мексидола, промежуточной — использование эмоксипина и пирацетама. Сравнивая результаты лабораторных изменений на фоне различных схем фармакотерапии с клиническими данными, установлено их совпадение. Своевременно начатое лечение, особенно использование сочетания актовегина и церетона, может на долгие годы сохранить профессиональную, социальную и бытовую адаптацию больных ХИМ, улучшить прогноз в отношении продолжительности жизни.

XV ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ «ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ» 1 – 4 ИЮНЯ 2015 ГОДА, САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, РОССИЯ

XV Всероссийский научный Форум с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» состоялся в Санкт-Петербурге 1 – 4 июня 2015 года в конгресс-холле «Васильевский» по адресу: Васильевский остров, набережная реки Смоленки, д. 2.

Так же как и в предыдущие годы, основными организаторами Форума являлись Институт экспериментальной медицины, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и Первый СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова в сотрудничестве с такими общественными организациями, как Санкт-Петербургское отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов и Российское научное общество иммунологов. Традиционно Форум проходил под эгидой Минздрава, РАН, Роспотребнадзора при поддержке Правительства Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе.

На Форуме 2015 г. состоялось вручение почетного знака имени академика В.И. Иоффе, учрежденного в 2003 г. СЗО РАМН и СПб РО РААКИ, следующим лауреатам:

- члену-корреспонденту РАН, профессору Кетлинскому Сергею Александровичу в номинации «За достижения в области фундаментальной иммунологии»;
- академику РАН, профессору Мазурову Вадиму Ивановичу в номинации «За достижения в области клинической иммунологии»;
- профессору Ласло Мароди (Laszlo Marodi), Дебрецен, Венгрия, в номинации «За вклад в развитие клинической иммунологии в Российской Федерации».

Традиционно на Форуме обсуждались самые актуальные вопросы фундаментальной и прикладной иммунологии, среди которых с каждым годом увеличивается доля молекулярно-биологических проблем. Это нашло отражение и в тематике материалов, представленных в этом году для участия в Форуме. Внимание многих участников Форума привлекли проблемы: антицитокиновой терапии аутоиммунных заболеваний, создания новых вакцин, модуляции иммунного ответа при опухолевом росте и при вирусных инфекциях, биологической роли антибиотических пептидов, механизмов баланса микробиоты и иммунной системы организма.

Из традиционных форм были сохранены вводные пленарные заседания с лекциями ведущих специалистов по вопросам, одинаково интересным для всей аудитории. Сохранена завоевавшая популярность традиция проведения отдельных заседаний «Клуба молодого иммунолога», посвященных вопросам фундаментальной и прикладной иммунологии с докладами самых молодых участников Форума. Проведен также специальный сателлитный симпозиум на тему «Первичные иммунодефициты» в рамках Международного образовательного проекта по первичным иммунодефицитам при активном участии отечественных и зарубежных специалистов.

В ряде случаев традиционные монотематические заседания уступали место «Круглым столам». Это дало возможность более широкому кругу участников принять участие в обсуждении проблем и перспектив развития лабораторной службы центров СПИД, диагностики и лечения первичных иммунодефицитов, этических проблем и практики вакцинации в разных странах. Последней проблеме был посвящен специальный сателлитный симпозиум, проведенный совместно с Европейским Форумом по качественной клинической практике (EFGCP). Многих участников Форума привлек и круглый стол «Стандартизация лабораторных иммунологических исследований».

Параллельно с заседаниями Форума проходила работа Всероссийской школы «Проточная цитометрия в диагностике иммунодефицитных состояний», которая включала лекции ведущих специалистов и практические занятия для овладения современными методами и современными приборами для лабораторной иммунологической диагностики.

В период подготовки Форума оргкомитетом были выбраны и сформулированы наиболее спорные на сегодняшний день вопросы: «полезна или вредна микробиота организма». Этот вопрос фундаментальной иммунологии горячо обсуждался на одном из заседаний круглого стола «Иммунологическая революция», на котором столкнулись противоположные точки зрения на этот вопрос иммунологов и микробиологов. Вторую дискуссию «Иммунологическая революция» посвятили спорным вопросам клинической иммунологической диагностики, касающимся установлению референтных величин нормы по каждому иммунологическому показателю.

Доклады, представленные на трех заседаниях «Клуба молодого иммунолога», свидетельствуют о том, что молодежь занята наиболее современными проблемами фундаментальной и прикладной иммунологии, владеет широким арсеналом современных иммунологических и молекулярно-биологических методов. Многие молодые докладчики продемонстрировали профессиональную зрелость и аналитические способности. Многие молодежные исследования выполнены с использованием тканевых и клеточных культур. Лучшие 9 докладов молодых иммунологов были отмечены и награждены конкурсной комиссией.

Также был проведен конкурс на лучший стендовый доклад по трем номинациям: иммунорегуляция, иммунодиагностика и иммунотерапия. Лучшие получили признание и были премированы.

Всего в работе Форума приняли участие более 460 человек. Форум вполне оправдал название Всероссийский, т.к. в нем приняли участие специалисты из 51 региона России: Абакан, Астрахань, Барнаул, Бердск, Великий Новгород, Владивосток, Волгоград, Екатеринбург, Иваново, Ижевск, Иркутск, Кабардино-Балкария, Казань, Калининград, Калужская область, Кемерово, Киров, Краснодар, Красноярск, Курск, Магадан, Майкоп, Москва, Московская область, Мурманская область, Нальчик, Нижний Новгород, Новокузнецк, Новосибирск, Омск, Оренбург, Пенза, Пермь, Петрозаводск, Ростов-на-Дону, Самара, Санкт-Петербург, Саранск, Саратов, Смоленск, Томск, Тюмень, Улан-Удэ, Ульяновск, Уфа, Хабаровск, Чебоксары, Челябинск, Чита, Якутск, Ярославль. Международное участие было представлено 23 коллегами из США, Канады, Германии, Франции, Испании, Венгрии, Польши, Словакии, Республики Гвинея, Белоруссии, Эстонии и Республики Молдова, доклады которых были посвящены:

- диагностике и лечению первичных иммунодефицитов;
- лихорадке, вызываемой вирусом Эбола;
- диагностике туберкулеза;
- аутоиммунным заболеваниям;
- биоэтическим вопросам применения иммунобиологических препаратов.

На форуме 2015 г. по сравнению с предыдущими годами отчетливо проявилась тенденция методического совершенствования исследований отечественных иммунологов, укрепления приборной базы, более широкого использования автоматизированных методов с объективным учетом результатов. Судя по представленным материалам, из года в год расширяется сфера применения иммуномодулирующих препаратов и других способов иммунокоррекции.

К сожалению, сохраняется существенный разрыв между современными достижениями фундаментальной иммунологии и их внедрением в клиническую практику. Страдает уровень подготовки врачей в области иммунологии, о чем свидетельствовали отдельные сообщения на секционных заседаниях.

На закрытии Форума было единодушно и с большим энтузиазмом принято пожелание продолжить традицию проведения «Дней иммунологии в Санкт-Петербурге».

Оргкомитет Форума считает своим приятным долгом выразить благодарность Комитету по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга, Генеральному спонсору – компании «КЕДРИОН БИОФАРМА», Главному спонсору – компании «БЕКМАН КУЛЬТЕР», а также спонсорам и участникам выставки, финансовая поддержка которых сделала возможной организацию и проведение Форума.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше. Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи,

но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции.

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление. — 2012. — Т. 11, №1. — С. 64–69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. — М.: Анахарсис, 2009. — 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. *Moscow: Anacharsis*, 2009, 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. *Basic and Clinical Immunology*. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соот-

ветствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL», а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большом количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам. Фотографии не должны иметь больших полей, т.е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отобра-

жаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Инфекция и иммунитет» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
- 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).
 - Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.

- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержанию в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, .rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Азарова Ю.Э.	381	Кляус Н.А.	378	Покровская Т.Г.	377
Албегова Д.З.	367	Козлов И.Г.	367	Покровский М.В.	377
Албегова Ж.К.	367	Козырь Л.А.	367	Поляков Д.В.	378, 380
Белоглазов В.А.	359	Конопля А.И.	376, 380, 381	Провоторов В.Я.	377
Блинов А.Е.	377	Конопля Е.Н.	378	Рагулина В.А.	379
Бурова Л.А.	303, 380	Кореньков Д.А.	347	Руденко Л.Г.	347
Бушмина О.Н.	375	Кортава М.А.	319	Сазонова О.В.	327
Быстрова Н.А.	381	Кягова А.А.	367	Седых С.Е.	378
Варламова О.Н.	377	Лаптев О.С.	367	Соколов А.В.	303, 380
Винникова С.В.	375	Литвинова Е.С.	375	Солошенко В.В.	378, 380
Власенко А.Ю.	380	Локтионов А.Л.	376, 378, 381	Старикова Э.А.	303, 380
Голдобин Д.Д.	376	Локтионова А.В.	375	Суняйкина О.А.	381
Гордиенко А.И.	359	Лосев И.В.	347	Тимохина В.И.	377
Григорьева Е.П.	347	Лунев М.А.	376	Устюгов Я.Ю.	319
Гурина О.П.	377	Микаелян П.К.	381	Фрейдлин И.С.	303, 380
Дементьева Е.А.	377	Найхин А.Н.	347	Харченко Е.П.	335
Джеллия А.Б.	319	Невинский Г.А.	378	Шадуро Д.В.	359
Донина С.А.	347	Негребеский В.В.	367	Ширинский В.С.	327
Дорошенко Е.М.	347	Неледова Н.С.	375	Ширинский И.В.	327
Ивлицкая И.Л.	377	Павлова С.И.	367	Шульгинова А.А.	382
Калиновская Н.Ю.	327	Петухова Г.Д.	347		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адоптивный перенос	368	иммуномодуляция.....	368
антиген CD69	319	иммуносупрессия.....	303, 368
антитела	335	интерфероны	319
антиэндотоксин-связывающий потенциал	359	контактная гиперчувствительность.....	368
аргининдеиминаза	303	лимфоциты	359, 368
белки	335	метилирование ДНК.....	328
вакцины	335	натуральные киллерные клетки	319
вирус гриппа.....	347	остеоартрит.....	328
В-лимфоциты	319	рассеянный склероз	319
гетеросубтипический иммунный ответ.....	347	сахарный диабет	328
живая гриппозная вакцина.....	347	системная красная волчанка	359
иммунизация	347	Т-лимфоциты	319
иммунная регуляция	335	флавоноиды.....	368
иммунная система.....	328	эндотоксин	359
иммунная толерантность	335	эпитопы	335
иммуноглобулины.....	319, 359	<i>Streptococcus pyogenes</i>	303

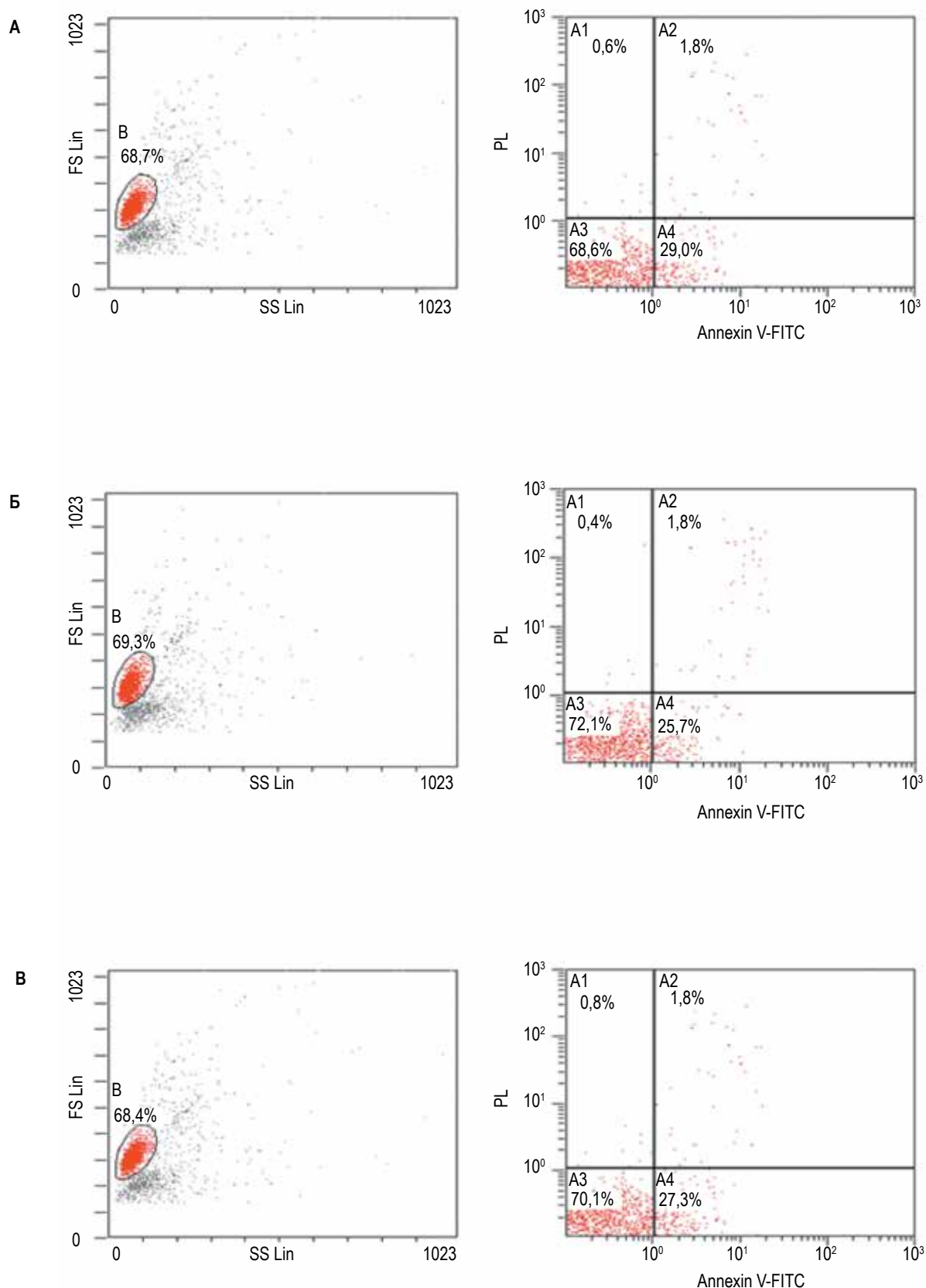


Рисунок 2. Оценка «раннего» апоптоза лимфоцитов-эффекторов КЧ при обработке МБФ и КД *in vitro* (8 ч инкубации)
Примечание. А – контроль, Б – инкубация с МБФ, В – инкубация с КД.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

