

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

Том 17, № 5. С. 389-492

2015

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

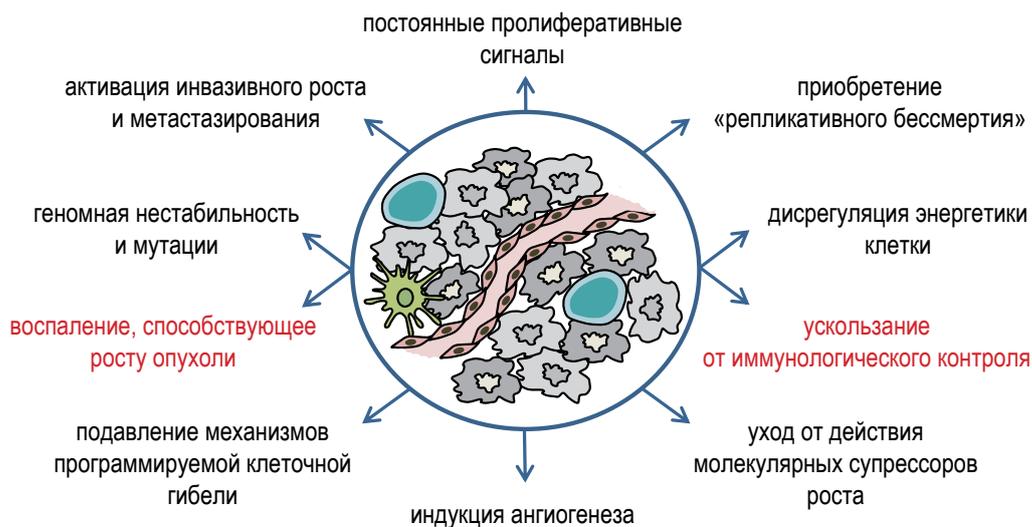
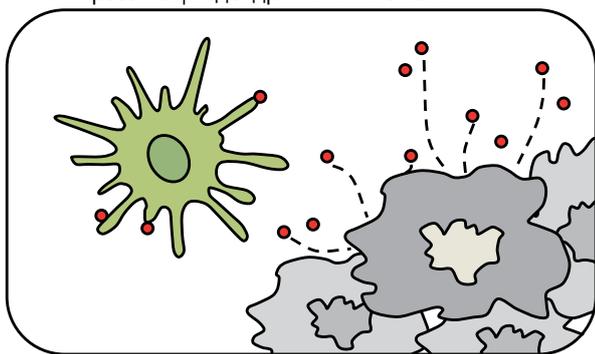


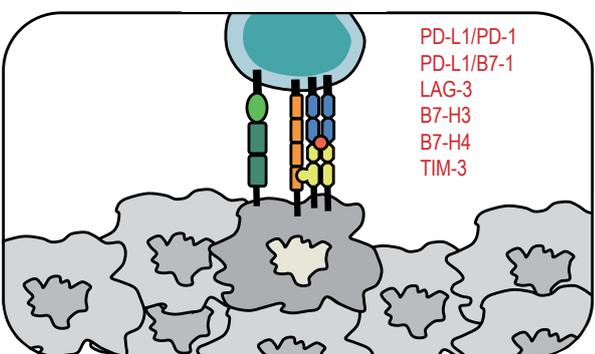
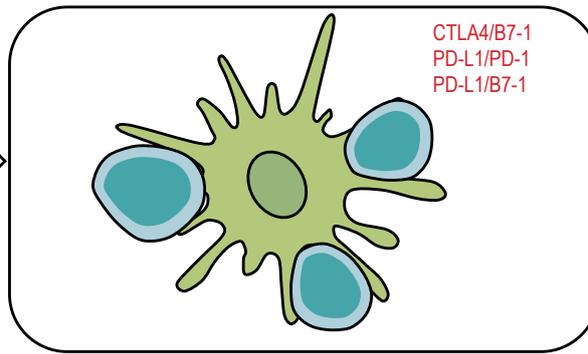
Рисунок 1. Признаки опухолей (по Hanahan and Weinberg, 2011)

Примечание. Красным выделены те признаки, в формировании которых принимают участие ИКТ и провоспалительные цитокины.

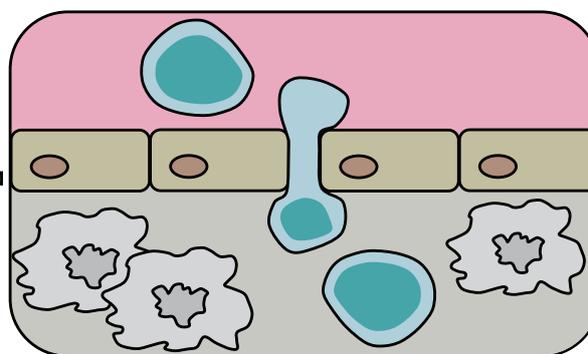
1. Высвобождение опухоль-ассоциированных антигенов и их презентация дендритными клетками



2. Прайминг и активация Т-клеток



4. Антиген-опосредованный киллинг опухолевых клеток



3. Проникновение активированных Т-клеток в опухоль

Рисунок 2. Опухелево-иммунологический цикл

Примечание. Красным представлены ИКТ, действующие на той или иной стадии цикла. На первом шаге происходит высвобождение опухоль-ассоциированных антигенов, их презентация на поверхности антиген-презентирующих клеток. На втором шаге эти клетки идут в лимфатические узлы и активируют специфичные к антигену Т-клетки. Третий шаг представляет собой инфильтрацию активированных Т-клеток в опухолевый очаг. На четвертом, заключительном шаге Т-клетки убивают опухолевые клетки по антиген-опосредованному механизму, что приводит к высвобождению опухоль-ассоциированных антигенов.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2015, том 17

№ 5

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 серозидемиологии, Санкт-Петербург, Россия

Редакционная коллегия

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

Кашкин Кирилл Павлович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, заведующий кафедрой иммунологии Российской медицинской академии последипломного 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, 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@spbraaci.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 17.09.2015 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 13. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1245

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 Флуминенсе, 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

Михале Ярослав – доктор медицинских наук, Университет Рамбам, 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**

September-October

2015, volume 17

No. 5

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, Russian Federation

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, Russian Federation

Editorial Board

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

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

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

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

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

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

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, Russian Federation

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

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, Russian Federation

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlovin, 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, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

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

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyi persp. Vasilevsky Island, 26, office 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 17.09.2015. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 13. 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, Russian Federation

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

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

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

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

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

Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А.

ИММУНОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ, ОСНОВАННАЯ НА БЛОКИРОВКЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ КОНТРОЛЬНЫХ «ТОЧЕК» («ЧЕКПОЙНТОВ»)395

Федоров А.С., Литвинова Л.С., Бут-Гусаим В.И., Литвиненко С.Н.

АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ: ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ407

Оригинальные статьи

Стагниева И.В., Симбирцев А.С.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РИНОСИНОСИТОМ423

Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Мошев А.В., Козлов В.А.

ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ431

Аверина О.В., Ермоленко Е.И., Ратушный А.Ю., Тарасова Е.А., Борщев Ю.Ю., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Котылева М.П., Даниленко В.Н., Суворов А.Н.

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*443

Краткие сообщения

Камышный А.М., Топол И.А.

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ КИШЕЧНО-АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА455

Балацкая Н.В., Еремеева Е.А., Слепова О.С., Рябина М.В., Куликова И.Г., Сорожкина Е.С.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ461

Иммунологические методы

Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.П., Продеус А.П.

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ ДНК ТРЕС И КРЕС В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ467

Черемных Е.Г., Иванов П.А., Фактор М.И., Карпова Н.С., Васильева Е.Ф., Гусев К.В., Брусов О.С.

НОВЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА479

Правила для авторов489

Авторский указатель492

Предметный указатель492

CONTENTS

Reviews

- Bogolyubova A.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A.*
CANCER IMMUNOTHERAPY BASED ON THE BLOCKADE OF IMMUNE CHECKPOINTS..... 395
- Fedorov A.S., Litvinova L.S., But-Gusaim V.I., Litvinenko S.N.*
ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY: VACCINES FOR ALLERGIC DISEASES407

Original articles

- Stagnieva I.V., Simbirtsev A.S.*
IMMUNOTHERAPY EFFICIENCY IN RHINOSINUSITIS PATIENTS423
- Borisov A.G., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V., Kozlov V.A.*
CHARACTERISTICS OF T- AND B-CELL SUBPOPULATION PROFILE IN THE PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE TREATED WITH VACCINE AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*431
- Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushny A.Yu., Tarasova E.A., Borschev Yu.Yu., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N.*
INFLUENCE OF PROBIOTICS ON CYTOKINE PRODUCTION IN THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* SYSTEMS443

Short communications

- Kamyshnyi A.M., Topol I.A.*
ACTIVATION MECHANISMS OF GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE UNDER CHRONIC SOCIAL STRESS CONDITIONS.....455
- Balatskaya N.V., Ereemeeva E.A., Slepova O.S., Ryabina M.V., Kulikova I.G., Sorozhkina E.S.*
PERIPHERAL BLOOD SUBPOPULATION OF LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION 461

Immunological methods

- Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P.*
DEVELOPMENT OF REAL-TIME MULTIPLEX PCR FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TREC'S AND KREC'S IN WHOLE BLOOD AND IN DRIED BLOOD SPOTS467
- Cheremnykh E.G., Ivanov P.A., Faktor M.I., Karpova N.S., Vasiljeva E.F., Gusev K.V., Brusov O.S.*
A NEW METHOD TO ASSESS FUNCTIONAL ACTIVITY OF SERUM COMPLEMENT SYSTEM 479

- Правила для авторов** 489
- Авторский указатель** 492
- Предметный указатель** 492

ИММУНОТЕРАПИЯ ОПУХОЛЕЙ, ОСНОВАННАЯ НА БЛОКИРОВКЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ КОНТРОЛЬНЫХ «ТОЧЕК» («ЧЕКПОЙНТОВ»)

Боголюбова А.В.^{1,2}, Ефимов Г.А.^{1,3}, Друцкая М.С.¹, Недоспасов С.А.^{1,2}

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

² ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Иммунологические контрольные «точки» (ИКТ, англ. Immunological checkpoints) – это система ингибиторных механизмов, которые регулируют активацию иммунного ответа, препятствуя запуску аутоиммунных процессов, а также модулируют его, уменьшая вызванные иммунными клетками повреждения в органах и тканях. Опухолевые клетки могут использовать такие контрольные точки для предотвращения активации опухоль-специфических лимфоцитов, таким образом, приобретая устойчивость к действию иммунной системы. Одним из перспективных методов иммунотерапии опухолей является блокировка ингибирующего сигнала, передающегося через иммунологические контрольные точки, приводящая к реактивации противоопухолевого иммунного ответа. Поскольку большая часть контрольных точек функционирует за счет взаимодействий лиганд-рецептор, одна из стратегий современной противоопухолевой терапии основана на создании терапевтических моноклональных антител, блокирующих лиганд или рецептор, а также растворимых рекомбинантных рецепторов, которые могли бы конкурировать за лиганд и таким образом модулировать передачу сигнала. В последние годы в этом направлении иммунотерапии опухолей получены впечатляющие успехи, однако потенциальной платой за вмешательство в естественные супрессорные механизмы является развитие аутоиммунных реакций.

Ключевые слова: рак, иммунотерапия, иммунологические контрольные точки, провоспалительные цитокины, моноклональные антитела, иммунология

CANCER IMMUNOTHERAPY BASED ON THE BLOCKADE OF IMMUNE CHECKPOINTS

Bogolyubova A.V.^{a,b}, Efimov G.A.^{a,c}, Drutskaya M.S.^a, Nedospasov S.A.^{a,b}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Immune checkpoints represent the system of inhibitory mechanisms regulating the activation of the immune response, preventing the autoimmune processes and modulating the immune response by decreasing

Адрес для переписки:

Боголюбова Аполлинария Васильевна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта» РАН
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-99-64.
Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Address for correspondence:

Bogolyubova Apollinariya V.
Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy
of Sciences
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilov str., 32.
Phone: 7 (499) 135-99-64.
Fax: 7 (499) 135-14-05.
E-mail: apollinariya.bogolyubova@gmail.com

Образец цитирования:

А.В. Боголюбова, Г.А. Ефимов, М.С. Друцкая, С.А. Недоспасов,
«Иммунотерапия опухолей, основанная на блокировке
иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов»»
// Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 395-406.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-395-406

© Боголюбова А.В. и соавт., 2015

For citation:

A.V. Bogolyubova, G.A. Efimov, M.S. Drutskaya, S.A. Nedospasov,
“Cancer immunotherapy based on the blockade of immune
checkpoints”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 395-406.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-395-406

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-395-406>

the immune cell-mediated damage of tissues and organs. Tumor cells may utilize these checkpoints to prevent the activation of tumor-specific lymphocytes, thereby acquiring resistance against the immune response. The blockade of inhibitory signal that is transduced in immune checkpoints leading to the reactivation of antitumor immune response is a promising method of tumor immunotherapy. Since the majority of immune checkpoints are based on the ligand-receptor interactions, one of contemporary modalities of anti-tumor therapy is based on the development of ligand- or receptor-blocking therapeutic monoclonal antibodies, as well as soluble recombinant receptors capable of competing for a ligand and thereby modulating the signal transduction. In the past few years, this field of tumor immunotherapy experienced an impressive success; however, the potential tradeoff for altering of the natural suppressive mechanisms is the development of the autoimmune reactions.

Keywords: cancer, immunotherapy, immune checkpoints, proinflammatory cytokines, monoclonal antibody, immunology

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 14-25-00160).

Введение

Согласно концепции иммунного надзора над опухолями в ее современном виде (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки), клетки иммунной системы могут модулировать рост и прогрессию злокачественного новообразования путем развития локального воспаления (прежде всего, клетками врожденной ветви иммунитета), продукцией антител, специфичных к опухоль-ассоциированным антигенам (В-клетки), контактными (НК- и НКТ-клетки), а также антиген-опосредованным (цитотоксические Т-клетки) цитолизом опухолевой клетки. Однако опухолевые клетки способны подавлять направленный против них иммунный ответ двумя способами: во-первых, избегая иммунологического надзора путем уменьшения экспрессии молекул HLA или продукцией неканонических форм этих молекул, а также уменьшая экспрессию опухоль-ассоциированных антигенов на своей поверхности, и, во-вторых, непосредственно блокируя активацию Т-лимфоцитов, вызывая анергию опухоль-специфичных клонов. В последнем случае один из молекулярных механизмов эвазии основан на передаче ингибирующего сигнала от рецепторов CTLA-4 или PD-1 на цитотоксических Т-лимфоцитах.

Биология цитотоксического Т-лимфоцитарного антигена-4 (CTLA-4)

Молекула CTLA-4, так же как и родственная ей молекула CD28, экспрессируется исключительно на Т-лимфоцитах и относится к корецепторам TCR (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки). Гены, кодирующие CTLA-4 и CD28, дуплицировались в ходе эволюции и находятся в непосредственной близости друг от друга на хромосоме 2q33 человека [47] или хромосоме 1 мыши [24]. Продукты обоих генов формируют гомодимеры, которые взаимодействуют с классическими костимуляторными молекулами CD80 и CD86 (B7.1 и B7.2) с различными константами аффинности.

Важно, что CTLA-4 связывается с молекулой CD80 в 16 раз сильнее, нежели CD28, и, таким образом, выигрывает в конкуренции за лиганд при экспрессии на поверхности клетки [45]. Сам CD28 является ключевым активирующим корецептором для TCR, и дополнительный сигнал с него необходим для продуктивной активации Т-клетки при ее взаимодействии с комплексом антигенный пептид-молекула МНС. Без костимуляции Т-клетка способна распознать антиген, но отсутствие амплификации сигнала переводит ее в состояние анергии, т.е. делает неспособной осуществлять эффекторную стадию иммунного ответа [80]. Близкородственный CD28 рецептор CTLA-4 является не активирующим, а ингибирующим, и его главная функция состоит в предупреждении возникновения аутоиммунных реакций и гиперактивации Т-клеток [35]. CTLA-4 эффективно конкурирует с CD28 за костимуляторные лиганды и тем самым модулирует иммунный ответ [48]. Кроме передачи ингибирующего сигнала внутрь Т-клетки (механизм которого не до конца понятен, однако ясно, что этот сигнал является ИТМ-независимым), CTLA-4 может также активно удалять молекулы CD80/CD86 с поверхности антиген-презентирующей клетки путем транс-эндоцитоза [60].

Рецепторы CD28 и CTLA-4 имеют различный профиль экспрессии на поверхности Т-лимфоцитов. Так, CD28 экспрессируется на покоящихся и активированных клетках, тогда как CTLA-4 появляется на поверхности клетки уже после формирования TCR-МНС комплекса при костимуляции CD28-CD80/86 [56], а также конститутивно экспрессируется на поверхности регуляторных Т-клеток [74]. В отличие от CD28, поступающего на поверхность Т-клетки сразу после своего биосинтеза, CTLA-4 присутствует в избытке во многих внутриклеточных структурах (транс-отдел аппарата Гольджи, эндосома и ли-

зосомы), и лишь небольшая часть белка появляется на поверхности клетки. По-видимому, механизм транспорта CTLA-4 на поверхность клетки является одним из ключевых событий в запуске ингибирующей реакции, однако не все шаги этого процесса достаточно хорошо изучены.

На эффективность транспорта молекулы CTLA-4 на поверхность клетки влияет как концентрация кальция в аппарате Гольджи, так и связывание TCR с МНС [1]. Было показано, что этот процесс контролируется молекулой TRIM [81], 30кДа трансмембранным белком, содержащим тирозинкиназные мотивы на цитоплазматическом конце, которые, по-видимому, способствуют ассоциации комплекса TCR/CD3 [6]. TRIM колокализуется с CTLA-4, находящимся в аппарате Гольджи, однако не обнаруживается рядом с CTLA-4 в эндосомах или на поверхности клетки [81]. Многочисленные эксперименты позволяют утверждать, что TRIM обладает функцией шаперона по отношению к CTLA-4, обеспечивая его перенос из внутренних компартментов клетки на ее поверхность [81]. Поверхностная экспрессия CTLA-4 также обусловлена гуанозин-трифосфатазами (GTPases), ARF-1 и фосфолипидом D (PLD), которые нужны для «отшнуровывания» везикул с CTLA-4 от аппарата Гольджи [2, 15]. Обратная интернализация CTLA-4 регулируется такими молекулами, как AP-1, AP-2 (адаптерные белки клатрина, не путать с транскрипционными факторами) [69] и киназой Rlk. Последняя может фосфорилировать CTLA-4, вызывая связывание его с PI3K и тем самым ингибируя эндоцитоз, опосредованный гетеротетрамерным комплексом AP1/AP2 [70].

Механизмы ингибирующего воздействия CTLA-4 на Т-клетки до сих пор остаются предметом дискуссий. По-видимому, можно выделить два типа подобных воздействий: внеклеточный и внутриклеточный. Внеклеточный включает в себя секрецию растворимой формы CTLA-4, продукцию индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), а также вовлечение в иммунный ответ регуляторных Т-клеток [66]. Внутриклеточный же механизм CTLA-4-зависимого ингибирования подразумевает конкуренцию с CD28 за лиганд [42], блокирование экспрессии липидных рафтов [40] и формирования иммунологического синапса [71], а также ассоциацию с фосфатазами и PP2A [33]. Более того, недавно было показано, что на поверхности Т-клетки может происходить опосредованный CTLA-4 транс-эндоцитоз, удаляющий CD80/86 с поверхности антиген-презентирующей клетки [60].

Биология белка программируемой смерти-1 (PD-1) и его лигандов

Рецептор PD-1 также относится к ИКТ (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки). Он был впервые идентифицирован по увеличению экспрессии на тимоцитах в ответ на проапоптотический стимул [26]. Дальнейшие исследования связали функцию этого рецептора с иммунологической толерантностью. Как и CTLA-4, PD-1 относится к семейству CD28 и имеет 23% гомологии с CTLA-4 по аминокислотной последовательности [52]. Однако, в отличие от CTLA-4, PD-1 имеет известные ITIM и ITSM мотивы в цитоплазматической части молекулы, что объясняет его ингибирующее действие. При антигенной стимуляции PD-1 привлекает тирозин-фосфатазу SHP-2 [51] к мотиву ITSM, в результате чего дефосфорилируются сигнальные молекулы, такие как Syk и PI3K [10]. В отличие от CTLA-4, PD-1 экспрессируется не только на активированных Т-клетках, но и на В-клетках и на клетках миелоидного ряда, что, по-видимому, указывает на более широкий спектр функций в регуляции работы иммунной системы [19]. Было также показано, что передача сигнала через PD-1 в некоторых ситуациях может не только ингибировать действие иммунной системы, но и, напротив, усиливать активацию Т-клеток [18, 79]. Механизм этого действия до сих пор неясен, но, по-видимому, он связан со способностью PD-1 ингибировать IFN γ -индуцированную продукцию окиси азота [87].

Известны два лиганда рецептора PD-1: PD-L1 и PD-L2 (B7-H1 и B7-DC соответственно), принадлежащие к семейству B7 [55]. Тканеспецифичность экспрессии этих молекул различна: PD-L1 детектируется на поверхности Т-, В-клеток, макрофагов, дендритных клеток, эндотелиальных клеток сердца, β -клеток поджелудочной железы, глиальных клеток [34, 67, 83], а PD-L2 экспрессируется лишь на активированных макрофагах и дендритных клетках [25]. Кроме того, экспрессия как PD-L1, так и PD-L2 была обнаружена в опухолевых клетках различного генеза: опухолях яичников [38], почки [76], мозга [84], пищевода [49], немелкоклеточном раке легкого [39] и др. При этом экспрессия PD-L1 на опухолевых клетках или на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах ассоциирована со снижением общей выживаемости пациентов с опухолью почки [12]. Более того, уровень экспрессии PD-L1 на этих клетках (в особенности на опухоль-инфильтрирующих лимфоцитах) может служить биомаркером для предсказания эффективности иммунотерапии с применением анти-PDL1 моноклональных антител [21].

Другие ИКТ

Chen и Mellman предложили представить взаимодействие опухоли и иммунной системы в виде так называемого опухолево-иммунологического цикла, в котором каждый из шагов опухолевой прогрессии регулируется теми или иными механизмами иммунитета (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки) [11]. Первым шагом цикла является высвобождение опухоль-ассоциированных антигенов, что приводит к презентации их на поверхности антиген-презентирующих клеток, которые далее мигрируют в лимфатические узлы, дренирующие опухолевый очаг, где и происходит активация Т-клеток (шаг 2). Активированные Т-клетки проникают в кровеносные сосуды, по которым путешествуют в опухолевый очаг, инфильтрируют его (шаг 3), распознают опухолевые клетки, несущие на своей поверхности пептиды опухоль-ассоциированных антигенов в контексте молекул главного комплекса гистосовместимости, и убивают их (шаг 4). «Классические» ИКТ (опосредованные CTLA-4, PD-1) действуют на второй шаг опухолево-иммунологического цикла (активация реактивных Т-клонов), однако существует ряд других молекул, которые можно отнести к ИКТ, ингибирование которых может привести к более эффективному лизису опухолевых клеток.

К ним относится рецептор LAG3, экспрессия которого повышена в регуляторных Т-клетках и в CD8⁺Т-клетках (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки), находящихся в состоянии анергии [7, 28, 50] TIM3 [72], являющийся рецептором галектина 9, ингибирует Т-хелперный ответ первого типа [89]. Как и PD-1, LAG3, TIM3 часто сверхэкспрессированы на поверхности одних и тех же опухолевых клеток, поэтому одним из подходов к иммунотерапии таких опухолей может быть их одновременное блокирование [54]. CD244 (также называемый 2B4) при взаимодействии со своим лигандом CD48 оказывает подавляющее действие на пролиферацию CD8⁺Т-клеток, поэтому его ингибирование также может быть применено для иммунотерапии опухолей, в частности множественной миеломы [27]. Модулирование активности таких молекул, как BTLA, A2aR, и различных KIR-рецепторов также может быть применимо в контексте иммунотерапии злокачественных новообразований человека [54].

Индукцибельный костимуляторный рецептор (ICOS), подобно CTLA-4, начинает экспрессироваться на поверхности Т-клеток при их активации (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки), а также детектируется на регуляторных Т-клетках, играя роль в гомеостазе последних [9]. Его лиганд, ICOSL,

присутствует на поверхности различных антиген-презентирующих клеток, таких как В-клетки, макрофаги и дендритные клетки, причем экспрессия также может быть индуцирована провоспалительными цитокинами, такими как TNF α и IL6, на эндотелиальных и эпителиальных клетках. Экспрессия ICOS и ICOSL опухолевыми клетками была показана для карциномы толстой кишки, меланомы, острого миелобластного лейкоза и других неоплазий. С одной стороны, повышенная экспрессия ICOS коррелировала с продолжительностью пост-рецидивной выживаемости пациентов [3], а также обратно коррелировала с наличием метастаз в лимфатических узлах и агрессивностью опухоли [32]. С другой же стороны, была показана вовлеченность ICOS-ICOSL сигнального каскада в гомеостаз регуляторных Т-клеток, способствующих прогрессии опухоли [41, 73, 75]. Более того, повышенный уровень экспрессии ICOS на CD4⁺Т-клетках может служить маркером благоприятного прогноза при терапии меланомы ипилимумабом (см. ниже [8]).

B7-H3 и B7-H4 – два лиганда, также являющиеся молекулами ИКТ. Рецепторы для этих лигандов до сих пор не идентифицированы (существует предположение, что B7-H3 связывается с TIGIT-2 [20]). Экспрессия этих молекул наблюдается не только на поверхности иммунных клеток [13] и других клеток организма (остеобластов, фибробластов, эпителиальных клеток и др. для B7-H3 [37]), но и на различных клетках опухолей (рак простаты, яичников, протоковая карцинома молочной железы). Как правило, такая нарушенная экспрессия связана с неблагоприятным прогнозом для пациентов [4, 68, 78, 88]. Основываясь на данных, полученных с применением мышиных моделей, начаты работы по созданию блокирующих агентов против B7-H3 [36] и B7-H4 [16], а также анализ их противоопухолевой активности *in vivo*.

Применение моноклональных антител для блокировки ИКТ при иммунотерапии опухолей

Первые исследования влияния блокировки CTLA-4 на усиление иммунного ответа были проведены в 1995 году группой М.К. Jenkins. Было показано, что анти-CTLA-4 Fab-фрагменты антител могут значительно усилить антиген-специфическую экспансию Т-клеток в лимфоузле [29]. Годом позже группой J.P. Allison было показано, что как полноразмерные антитела против CTLA-4, так и очищенный Fab-фрагмент ведут к пролиферации Т-клеток, специфичных к суперантигену SEB – энтеротоксину В стафилококка [30]. Основываясь на полученных данных, авто-

ры предположили, что применение блокирующих антител против CTLA-4 может реактивировать антигенспецифический Т-клеточный ответ в опухоли, способствуя ее разрушению.

В ходе доклинических испытаний на мышах Allison с соавторами показали, что блокировка CTLA-4 антителами *in vivo* действительно эффективна при иммунотерапии опухолей [31]. Так, у мышей с высокоиммуногенными опухолями (например, быстрорастущими фибросаркомами A/JCr и Sa1N) после введения терапевтических антител наблюдался значительный противоопухолевый иммунный ответ. Малоиммуногенные опухоли (B16 меланома) не отвечали на такую терапию, однако при ее комбинации с GM-CSF-вакциной опухолевая масса также начинала уменьшаться. Таким образом, было показано, что при наличии предсуществующего противоопухолевого иммунного ответа блокировка CTLA-4 может быть применима в качестве одной из стратегий иммунотерапии. Эти данные позволили начать клинические испытания с использованием двух первых препаратов гуманизированных анти-CTLA-4 антител – ипилимумаба (ipilimumab) и тремелиумаба (tremelimumab).

Первая стадия клинических испытаний ипилимумаба [22] показала не только безопасность этого лекарства, но и выявила яркие клинические эффекты: некроз или значительный CD8⁺ лимфоцитарный инфильтрат опухолевой ткани (3/7 и 2/7 пациента с неоперабельной формой метастатической меланомы соответственно), а также снижение/стабилизацию уровня СА-125 (2/2 пациентов с карциномами яичника). Наблюдавшиеся же побочные эффекты (миалгия, артралгия, анорексия, утомление, сухой кашель, появление низкого титра аутоантител в крови больных и др.) были сходны с таковыми при стандартных методах лечения. При комбинации анти-CTLA4 терапии с вакцинацией двумя пептидами из меланомного антигена gp100, полная либо частичная ремиссия наблюдалась у 2/14 пациентов [57].

Эти достаточно яркие эффекты на первой фазе позволили перейти к фазам II и III клинических испытаний ипилимумаба. Так, в третьей фазе испытаний [23] участвовали 676 пациентов с III/IV стадией метастатической меланомы, которые получали ипилимумаб плюс gp100 вакцину (403 пациента), ипилимумаб или gp100 вакцину в монотерапии (137 и 136 пациентов соответственно). Общая выживаемость в группе, получавшей ипилимумаб в качестве монотерапии, была наибольшей (максимальная выживаемость 27,8 месяцев со средней общей выживаемостью 10,1 месяцев);

группа же, получавшая комбинацию препаратов, отвечала на терапию практически на том же уровне (максимум 21,0 месяц, среднее значение – 10,0 месяцев). Более того, в группе пациентов с монотерапией ипилимумабом наблюдалось меньше побочных эффектов по сравнению с другими группами. По результатам клинических испытаний ипилимумаб был разрешен FDA к применению для лечения пациентов с метастатической меланомой, что стало знаменательным событием не только в онкоиммунологии, но и в клинической онкологии.

До сих пор остается без ответа вопрос о том, какой из механизмов действия анти-CTLA-4 – подавление иммуносупрессии активированных Т-лимфоцитов или же деплеция регуляторных Т-клеток – является доминирующим в суммарном эффекте препарата. Последние эксперименты позволяют утверждать, что удаление регуляторных Т-клеток по Fc-зависимому механизму возможно с участием неклассической экспрессирующей FcγRIIIA(CD16) субпопуляции моноцитов [65]. Однако эти данные получены в системе *ex vivo*, поэтому говорить о полном подтверждении этой гипотезы на данный момент преждевременно.

В ходе третьей фазы клинических испытаний [62] тремелиумаб (IgG2 блокирующее CTLA-4 моноклональное антитело) не показал значительного противоопухолевого эффекта по сравнению со стандартной химиотерапией пациентов с прогрессирующей меланомой (средняя общая выживаемость составила 12,6 месяцев против 10,7). Хотя результаты клинических испытаний показали, что продолжительность ответа на лечение значительно выше в случае тремелиумаба (35,8 против 13,7 месяцев при лечении в соответствии со стандартными протоколами химиотерапии), было решено прекратить его дальнейшие испытания, так что на данный момент этот препарат не нашел применения в клинике [63]. Тем не менее, в настоящее время проходят клинические испытания по использованию тремелиумаба в сочетании с другими терапевтическими агентами в лечении неоперабельной злокачественной мезотелиомы, аденокарциномы желудка, немелкоклеточного рака легкого, рака головы и шеи и других злокачественных новообразований различного генеза.

Еще более успешным стало терапевтическое ингибирование PD-1. Первые клинические испытания препарата MDX-1106 [4] (позже получившего название ниволумаб) на основе моноклональных антител против PD-1 были начаты в 2010 году. В первой фазе приняли участие 39 па-

циентов с метастатической меланомой, колоректальным раком, раком простаты, почки или мелкоклеточным раком легких. Уже на первой фазе испытаний препарат не только оказался безопасным, но и вызвал явные противоопухолевые эффекты. Так, после однократного введения препарата у одного пациента наступила полная ремиссия, у 2/39 – частичная ремиссия, еще у 2/39 наблюдалось значительное уменьшение опухолевой массы, которое, однако, было недостаточным, чтобы говорить о ремиссии. Учитывая успех ипилимумаба, дальнейшие клинические испытания проходили по ускоренной программе [5], и в декабре 2014 года [61] препарат ниволумаб был одобрен FDA для лечения меланомы [17], а в марте 2015 года – для лечения метастатического рака легкого [90].

Другой анти-PD-1 препарат, МК-3475 (пембролизумаб), также успешно прошел испытания. В первой фазе испытаний приняли участие 173 пациента, причем у 24% пациентов наблюдался объективный противоопухолевый ответ длительностью от 1,4 до 8,5 месяцев [64]. В результате пембролизумаб в том же 2014 году был одобрен для лечения меланомы [61].

Кроме того, в мае 2014 года была завершена первая фаза клинических испытаний нового блокатора PD-L1, MPDL3280A (позже назван-

ного атезолизумабом) [59]. Результаты оказались ошеломляющими: объективный ответ спустя 6 недель после применения препарата наблюдался у 43% (13/30) пациентов, позитивных по экспрессии PD-L1 в ткани опухоли, и у 11% пациентов, негативных по PD-L1. Более того, у двух пациентов произошла полная регрессия опухолей. В ноябре 2014 г. в журнале Nature была опубликована целая серия статей, посвященных атезолизумабу и его противоопухолевым эффектам. В них, в частности, была показана статистически значимая ($p = 0,015$) ассоциация между экспрессией PD-L1 на поверхности опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов (но не опухолевых клеток) и ответом на терапию [21]. У отвечающих на терапию пациентов наблюдалось повышенное количество CD8-, PD-1, PD-L1-экспрессирующих клеток на инвазивной границе и внутри опухоли, а также менее широкий репертуар клонов T-клеточных рецепторов опухоль-инфильтрирующих лимфоцитов [80].

Побочные эффекты новых методов иммунотерапии опухолей и возможные пути их преодоления

Терапевтическая блокировка ИКТ сопряжена с появлением целого ряда побочных эффектов воспалительной и аутоиммунной природы. Они могут затрагивать практически все органы и ткани человека, однако наиболее часты поражения

ТАБЛИЦА 1. СПИСОК ОСНОВНЫХ ПРЕПАРАТОВ, БЛОКИРУЮЩИХ ИКТ И ПРОВосПАЛИТЕЛЬНЫЕ ЦИТОКИНЫ (TNF, IL-6)

Название	Коммерческие названия	Мишень	Описание	Ссылки
Ипилимумаб	Yervoy	CTLA-4	человеческое моноклональное антитело IgG1 изотипа	8, 22, 23, 57, 58
Тремелимумаб	–	CTLA-4	человеческое моноклональное антитело IgG2 изотипа	62, 63
Ниволумаб	Opdivo	PD-1	человеческое моноклональное антитело IgG4 изотипа	4, 17, 58, 61, 90
Пембролизумаб	Keytruda	PD-L1	гуманизированное моноклональное антитело IgG4 изотипа	61, 64
Атезолизумаб	–	PD-L1	гуманизированное моноклональное антитело IgG1 изотипа	21, 59, 80
Инфликсимаб	Remicade	TNF	химерное моноклональное антитело IgG1 изотипа	44, 46, 53
Адалимумаб	Humira	TNF	человеческое моноклональное антитело IgG1 изотипа	–
Тоцилизумаб*	Actemra	IL-6R	химерное моноклональное антитело IgG1 изотипа	–

Примечание. * – в данный момент также проводятся клинические испытания гуманизированных антител против IL-6.

кожи, желудочно-кишечного тракта, печени и органов эндокринной системы. Интересно, что процент пациентов с тем или иным симптомом сильно различается при блокировке CTLA-4 (ипилиумаб) и PD-1/PD-L1 (ниволумаб, пембролизумаб, атезолизумаб).

У примерно 50% пациентов, принимавших ипилиумаб, наблюдали сыпь и раздражение слизистых оболочек [82], в то время как подобные симптомы проявляются лишь у 6,5% пациентов, находящихся на лечении PD-1/PD-L1 блокаторами [77]. Эти побочные эффекты достаточно безобидны и, как правило, снимались препаратами на основе кортикостероидов.

Диарея и колит аутоиммунной природы встречались немного реже (30% и 1-2% для анти-CTLA-4 и анти-PD-1/PD-L1 соответственно [23, 77]), однако у значительной части этих пациентов (по данным клинических испытаний, около 1/3) наблюдалась тяжелая форма этих побочных эффектов, требующая серьезного лечения. Так, если стандартная терапия кортикостероидами не приводила к уменьшению симптомов, пациентам рекомендовали применение инфликсимаба (блокатора фактора некроза опухолей, TNF) в расчете 5 мг/кг каждые две недели [44, 46, 53]. Кроме того, могут применяться и другие блокаторы провоспалительных цитокинов, например, тоцилизумаб – блокатор IL-6R или же другой анти-TNF препарат под названием адалимумаб.

Гепатотоксичность встречалась у 10% и 5% пациентов, принимающих анти-CTLA-4 и анти-PD-1/PD-L1 препараты соответственно [62, 77, 85]. Как и в случае вышеописанных побочных эффектов, стандартной терапией при ней является введение кортикостероидов. Остальные побочные эффекты, такие как эндокринопатия, воспалительная пневмония, почечная недостаточность и другие, встречались достаточно редко.

Побочные эффекты комбинированной блокировки CTLA-4 (ипилиумаб) и PD-1 (ниволумаб) на данный момент изучены на пациентах с распространенной меланомой [86]. Серьезные побочные эффекты наблюдались у 50% пациентов, находившихся на этом виде иммунотерапии, что значительно выше, чем схожие показатели для монотерапии блокаторами ИКТ. Таким образом, на сегодняшний момент вопрос о способах снятия побочных эффектов такой иммунотерапии стоит особенно остро. В этом контексте идея о применении антицитокиновой терапии в комбинации с блокаторами CTLA-4 и PD-1/PD-L1 выглядит очень привлекательно.

Заключение

История иммунотерапии опухолей с применением моноклональных антител, блокирующих ИКТ, насчитывает уже более 20 лет. Она началась с открытия и клонирования ингибирующих рецепторов и изучения их сигнальных каскадов. Была сформулирована концепция «механизмов торможения», предотвращающих противоопухолевый иммунный ответ. Эксперименты на мышах позволили проверить эту концепцию *in vivo* и перейти к доклиническим и клиническим испытаниям соответствующих терапевтических антител. И если на доклинические и клинические испытания ипилиумаба, первого такого препарата, ушло около 15 лет, то последующие лекарства успевали пройти этот путь в три раза быстрее, за 5 лет. На мировой фармацевтический рынок поступает все больше и больше подобных лекарств, демонстрирующих многообещающие эффекты на онкологических больных, хотя по-прежнему остаются нерешенными несколько фундаментальных вопросов современной онкологии, ответы на которые позволят существенно расширить возможности подобных блокирующих реагентов [54]. Во-первых, необходимо понять, какие сигнальные каскады в ИКТ оказывают доминантный эффект в той или иной неоплазии. Детальная стратификация опухолей позволила бы более точно определять целевую группу пациентов для каждого конкретного препарата, тем самым увеличивая эффективность лечения. Во-вторых, остается открытым вопрос о разработке стратегий лечения, основанных на комбинации нескольких блокаторов ИКТ, а также других противоопухолевых препаратов. Так, недавно была опубликована статья, которая показала значительное увеличение продолжительности периода без прогрессирования заболевания для пациентов с меланомой при их лечении комбинацией ипилиумаба и ниволумаба [58]. Более того, результаты экспериментов с использованием мышинных моделей позволяют утверждать, что совместное использование блокаторов ИКТ и ингибиторов онкогенов (например, протеинкиназы BRAF) может усилить противоопухолевый иммунный ответ [14, 43]. Тем не менее, противоопухолевые препараты могут не только усиливать действие блокаторов, но и, наоборот, снижать его. Изучая подобные взаимодействия между препаратами, можно не только создавать оптимальные комбинации их, но и при помощи такого подхода ответить на фундаментальные вопросы современной онкоиммунологии о взаимодействии иммунных и неопластических клеток.

Список литературы / References

1. Alegre M.L., Noel P.J., Eisfelder B.J., Chuang E., Clark M.R., Reiner S.L., Thompson C.B. Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 11, pp. 4762-4770.
2. Béraud-Dufour S., Balch W. A journey through the exocytic pathway. *J. Cell Sci.*, 2002, Vol. 115, Pt 9, pp. 1779-1780.
3. Bogunovic D.I., O'Neill D.W., Belitskaya-Levy I., Vacic V., Yu Y.L., Adams S., Darvishian F., Berman R., Shapiro R., Pavlick A.C., Lonardi S., Zavadil J., Osman I., Bhardwaj N. Immune profile and mitotic index of metastatic melanoma lesions enhance clinical staging in predicting patient survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2009, Vol. 106, no. 48, pp. 20429-20434.
4. Brahmer J.R. Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety, clinical activity, pharmacodynamics, and immunologic correlates. *J. Clin. Oncol.*, 2010, Vol. 28, no. 19, pp. 3167-3175.
5. Brahmer J.R.I., Tykodi S.S., Chow L.Q., Hwu W.J., Topalian S.L., Hwu P., Drake C.G., Camacho L.H., Kauh J., Odunsi K., Pitot H.C., Hamid O., Bhatia S., Martins R., Eaton K., Chen S., Salay T.M., Alaparthi S., Grosso J.F., Korman A.J., Parker S.M., Agrawal S., Goldberg S.M., Pardoll D.M., Gupta A., Wigginton J.M. Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 366, no. 26, pp. 2455-2465.
6. Bruyns E. T cell receptor (TCR) interacting molecule (TRIM), a novel disulfide-linked dimer associated with the TCR-CD3-zeta complex, recruits intracellular signaling proteins to the plasma membrane. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 3, pp. 561-575.
7. Cai X.F.I., Tao Z., Yan Z.Q., Yang S.L., Gong Y. Molecular cloning, characterisation and tissue-specific expression of human LAG3, a member of the novel Lag1 protein family. *DNA Seq.*, 2003, Vol. 14, no. 2, pp. 79-86.
8. Carthon B.C.1, Wolchok J.D., Yuan J., Kamat A., Ng Tang D.S., Sun J., Ku G., Troncoco P., Logothetis C.J., Allison J.P., Sharma P. Preoperative CTLA-4 blockade: tolerability and immune monitoring in the setting of a presurgical clinical trial. *Clin. Cancer Res.*, 2010, Vol. 16, no. 10, pp. 2861-2871.
9. Ceeraz S., Nowak E.C., Noelle R.J. B7 family checkpoint regulators in immune regulation and disease. *Trends in Immunology*, 2013, Vol. 34, no. 11, pp. 556-563.
10. Chemnitz J.M. SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 2, pp. 945-954.
11. Chen D.S., Mellman I. Oncology meets immunology: the cancer-immunity cycle. *Immunity*, 2013, Vol. 39, no. 1, pp. 1-10.
12. Choueiri T.K., Fay A.P., Gray K.P., Callea M., Ho T.H., Albiges L., Bellmunt J., Song J., Carvo I., Lampron M., Stanton M.L., Hodi F.S., McDermott D.F., Atkins M.B., Freeman G.J., Hirsch M.S., Signoretti S. PD-L1 expression in nonclear-cell renal cell carcinoma. *Ann. Oncol.*, 2014, Vol. 25, no. 11, pp. 2178-2184.
13. Collins M., Ling V., Carreno B.M. The B7 family of immune-regulatory ligands. *Genome Biol.*, 2005, Vol. 6, no. 6, p. 223.
14. Cooper Z.A., Juneja V.R., Sage P.T., Frederick D.T., Piris A., Mitra D., Lo J.A., Hodi F.S., Freeman G.J., Bosenberg M.W., McMahon M., Flaherty K.T., Fisher D.E., Sharpe A.H., Wargo J.A. Response to BRAF Inhibition in Melanoma Is Enhanced When Combined with Immune Checkpoint Blockade. *Cancer Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2, no. 7, pp. 643-654.
15. D'Souza-Schorey C., Chavrier P. ARF proteins: roles in membrane traffic and beyond. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2006, Vol. 7, no. 5, pp. 347-358.
16. Dangaj D., Scholler N. Blocking the B7-H4 pathway with novel recombinant antibodies enhances T cell-mediated antitumor responses. *Oncimmunology*, 2013, Vol. 2, no. 8, p. e25913.
17. Deeks E.D. Nivolumab: a review of its use in patients with malignant melanoma. *Drugs*, 2014, Vol. 74, no. 11, pp. 1233-1239.
18. Dong H. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat. Med.*, 1999, Vol. 5, no. 12, pp. 1365-1369.
19. Greenwald R.J., Freeman G.J., Sharpe A.H. The B7 family revisited. *Annu. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 23, pp. 515-548.
20. Hashiguchi M., Kobori H., Ritprajak P., Kamimura Y., Kozono H., Azuma M. Triggering receptor expressed on myeloid cell-like transcript 2 (TLT-2) is a counter-receptor for B7-H3 and enhances T cell responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, Vol. 105, no. 30, pp. 10495-10500.
21. Herbst R.S., Soria J.C., Kowanetz M., Fine G.D., Hamid O., Gordon M.S., Sosman J.A., McDermott D.F., Powderly J.D., Gettinger S.N., Kohrt H.E., Horn L., Lawrence D.P., Rost S., Leabman M., Xiao Y., Mokatrinn A., Koeppen H., Hegde P.S., Mellman I., Chen D.S., Hodi F.S. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature. Nature Publishing Group*, 2014, Vol. 515, no. 7528, pp. 563-567.

22. Hodi F.S. Biologic activity of cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 antibody blockade in previously vaccinated metastatic melanoma and ovarian carcinoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, Vol. 100, pp. 4712-4717.
23. Hodi F.S., O'Day S.J., McDermott D.F., Weber R.W., Sosman J.A., Haanen J.B., Gonzalez R., Robert C., Schadendorf D., Hassel J.C., Akerley W., van den Eertwegh A.J., Lutzky J., Lorigan P., Vaubel J.M., Linette G.P., Hogg D., Ottensmeier C.H., Lebbé C., Peschel C., Quirt I., Clark J.I., Wolchok J.D., Weber J.S., Tian J., Yellin M.J., Nichol G.M., Hoos A., Urban W.J. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2010, Vol. 363, no. 8, pp. 711-723.
24. Howard T.A., Rochelle J.M., Seldin M.F. CD28 and CTLA-4, two related members of the Ig supergene family, are tightly linked on proximal mouse chromosome 1. *Immunogenetics*, 1991, Vol. 33, no. 1, pp. 74-76.
25. Ishida M., Iwai Y., Tanaka Y., Okazaki T., Freeman G.J., Minato N., Honjo T. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunol. Lett.*, 2002, Vol. 84, no. 1, pp. 57-62.
26. Ishida Y., Agata Y., Shibahara K., Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.*, 1992, Vol. 11, no. 11, pp. 3887-3895.
27. Jing W., Gershan J.A., Weber J., Tlomak D., McOlash L., Sabatos-Peyton C., Johnson B.D. Combined immune checkpoint protein blockade and low dose whole body irradiation as immunotherapy for myeloma. *J. Immunother. Cancer. BioMed Central Ltd*, 2015, Vol. 3, no. 1, p. 2.
28. Kakavand H., Wilmott J.S., Menzies A.M., Vilain R., Haydu L.E., Yearley J.H., Thompson J.F., Kefford R.F., Hersey P., Long G.V. Sclerostin expression and tumor-infiltrating lymphocytes define different subsets of MAPK inhibitor treated melanoma patients. *Clin. Cancer Res.*, 2015.
29. Kearney E.R., Walunas T.L., Karr R.W., Morton P.A., Loh D.Y., Bluestone J.A., Jenkins M.K. Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4⁺ T cells *in vivo* is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 155, no. 3, pp. 1032-1036.
30. Krummel M.F., Sullivan T.J., Allison J.P. Superantigen responses and co-stimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion *in vitro* and *in vivo*. *Int. Immunol.*, 1996, Vol. 8, no. 4, pp. 519-523.
31. Leach D.R., Krummel M.F., Allison J.P. Enhancement of antitumor immunity by CTLA-4 blockade. *Science*, 1996, Vol. 271, pp. 1734-1736.
32. Lee H. Peripheral blood gene expression of B7 and CD28 family members associated with tumor progression and microscopic lymphovascular invasion in colon cancer patients. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 2010, Vol. 136, no. 9, pp. 1445-1452.
33. Lee K.M., Chuang E., Griffin M., Khattri R., Hong D.K., Zhang W., Straus D., Samelson L.E., Thompson C.B., Bluestone J.A. Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. *Science*, 1998, Vol. 282, no. 5397, pp. 2263-2266.
34. Liang S.C., Latchman Y.E., Buhlmann J.E., Tomczak M.F., Horwitz B.H., Freeman G.J., Sharpe A.H. Regulation of PD-1, PD-L1, and PD-L2 expression during normal and autoimmune responses. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, no. 10, pp. 2706-2716.
35. Linsley P.S. Distinct roles for CD28 and cytotoxic T lymphocyte-associated molecule-4 receptors during T cell activation? *J. Exp. Med.*, 1995, Vol. 182, no. 2, pp. 289-292.
36. Loo D., Alderson R.F., Chen F.Z., Huang L., Zhang W., Gorlatov S., Burke S., Ciccarone V., Li H., Yang Y., Son T., Chen Y., Easton A.N., Li J.C., Rillema J.R., Licea M., Fieger C., Liang T.W., Mather J.P., Koenig S., Stewart S.J., Johnson S., Bonvini E., Moore P.A. Development of an Fc-enhanced anti-B7-H3 monoclonal antibody with potent antitumor activity. *Clin. Cancer Res.*, 2012, Vol. 18, no. 14, pp. 3834-3845.
37. Loos M., Hedderich D.M., Friess H., Kleeff J. B7-H3 and its role in antitumor immunity. *Clin. Dev. Immunol.*, 2010, Vol. 2010, p. 683875.
38. Maine C.J. Programmed death ligand-1 over-expression correlates with malignancy and contributes to immune regulation in ovarian cancer. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2014, Vol. 63, no. 3, pp. 215-224.
39. Mao Y., Li W., Chen K., Xie Y., Liu Q., Yao M., Duan W., Zhou X., Liang R., Tao M. B7-H1 and B7-H3 are independent predictors of poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Oncotarget.*, 2015, Vol. 6, no. 5, pp. 3452-3461.
40. Martin M., Schneider H., Azouz A., Rudd C.E. Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 and CD28 modulate cell surface raft expression in their regulation of T cell function. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 11, pp. 1675-1681.
41. Martin-Orozco N., Li Y., Wang Y., Liu S., Hwu P., Liu Y.J., Dong C., Radvanyi L. Melanoma cells express ICOS ligand to promote the activation and expansion of T-regulatory cells. *Cancer Res.*, 2010, Vol. 70, no. 23, pp. 9581-9590.
42. Masteller E.L., Chuang E., Mullen A.C., Reiner S.L., Thompson C.B. Structural analysis of CTLA-4 function *in vivo*. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, no. 10, pp. 5319-5327.
43. McArthur G.A., Ribas A. Targeting Oncogenic Drivers and the Immune System in Melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2012, Vol. 31, no. 4, pp. 499-506.

44. Merrill S.P., Reynolds P., Kalra A., Biehl J., Vandivier R.W., Mueller S.W. Early administration of infliximab for severe ipilimumab-related diarrhea in a critically ill patient. *Ann. Pharmacother.*, 2014, Vol. 48, no. 6, pp. 806-810.
45. Minor D.R., Chin K., Kashani-Sabet M. Infliximab in the treatment of anti-CTLA4 antibody (Ipilimumab) induced immune-related colitis. *Cancer Biother. Radiopharm.*, 2009, Vol. 24, no. 3, pp. 321-325.
46. Naluai A.T., Nilsson S., Samuelsson L., Gudjónsdóttir A.H., Ascher H., Ek J., Hallberg B., Kristiansson B., Martinsson T., Nerman O., Sollid L.M., Wahlström J. The CTLA4/CD28 gene region on chromosome 2q33 confers susceptibility to celiac disease in a way possibly distinct from that of type 1 diabetes and other chronic inflammatory disorders. *Tissue Antigens*, 2000, Vol. 56, no. 4, pp. 350-355.
47. Nivolumab Approved for Lung Cancer. *Cancer Discov.*, 2015.
48. Noel P.J., Boise L.H., Thompson C.B. Regulation of T cell activation by CD28 and CTLA4. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1996, Vol. 406, pp. 209-217.
49. Ohigashi Y., Sho M., Yamada Y., Tsurui Y., Hamada K., Ikeda N., Mizuno T., Yoriki R., Kashizuka H., Yane K., Tsushima F., Otsuki N., Yagita H., Azuma M., Nakajima Y. Clinical significance of programmed death-1 ligand-1 and programmed death-1 ligand-2 expression in human esophageal cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 8, pp. 2947-2953.
50. Okamura T. Roles of LAG3 and EGR2 in regulatory T cells. *Ann. Rheum. Dis.*, 2012, Vol. 71, Suppl. 2, pp. i96-i100.
51. Okazaki T., Maeda A., Nishimura H., Kurosaki T., Honjo T. PD-1 immunoreceptor inhibits B cell receptor-mediated signaling by recruiting src homology 2-domain-containing tyrosine phosphatase 2 to phosphotyrosine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2001, Vol. 98, no. 24, pp. 13866-13871.
52. Okazaki T., Honjo T. The PD-1-PD-L pathway in immunological tolerance. *Trends Immunol.*, 2006, Vol. 27, no. 4, pp. 195-201.
53. Pagès C., Gornet J.M., Monsel G., Allez M., Bertheau P., Bagot M., Lebbé C., Viguier M. Ipilimumab-induced acute severe colitis treated by infliximab. *Melanoma Res.*, 2013, Vol. 23, no. 3, pp. 227-230.
54. Pardoll D.M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nature Reviews Cancer*, 2012, Vol. 12, no. 4, pp. 252-264.
55. Pedoeem A., Azoulay-Alfaguter I., Strazza M., Silverman G.J., Mor A. Programmed death-1 pathway in cancer and autoimmunity. *Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 153, no. 1, pp. 145-152.
56. Perkins D., Wang Z., Donovan C., He H., Mark D., Guan G., Wang Y., Walunas T., Bluestone J., Listman J., Finn P.W. Regulation of CTLA-4 expression during T cell activation. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 156, no. 11, pp. 4154-4159.
57. Phan G.Q., Yang J.C., Sherry R.M., Hwu P., Topalian S.L., Schwartzentruber D.J., Restifo N.P., Haworth L.R., Seipp C.A., Frenkel L.J., Morton K.E., Mavroukakis S.A., Duray P.H., Steinberg S.M., Allison J.P., Davis T.A., Rosenberg S.A. Cancer regression and autoimmunity induced by cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 blockade in patients with metastatic melanoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2003, Vol. 100, pp. 8372-8377.
58. Postow M.A., Chesney J., Pavlick A.C., Robert C., Grossmann K., McDermott D., Linette G.P., Meyer N., Giguere J.K., Agarwala S.S., Shaheen M., Ernstoff M.S., Minor D., Salama A.K., Taylor M., Ott P.A., Rollin L.M., Horak C., Gagnier P., Wolchok J.D., Hodi F.S. Nivolumab and Ipilimumab versus Ipilimumab in Untreated Melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 372, no. 21, pp. 2006-2017.
59. Powles T., Eder J.P., Fine G.D., Braiteh F.S., Loria Y., Cruz C., Bellmunt J., Burris H.A., Petrylak D.P., Teng S.L., Shen X., Boyd Z., Hegde P.S., Chen D.S., Vogelzang N.J. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature. Nature Publishing Group*, 2014, Vol. 515, no. 7528, pp. 558-562.
60. Qureshi O.S., Zheng Y., Nakamura K., Attridge K., Manzotti C., Schmidt E.M., Baker J., Jeffery L.E., Kaur S., Briggs Z., Hou T.Z., Futter C.E., Anderson G., Walker L.S., Sansom D.M. Trans-endocytosis of CD80 and CD86: a molecular basis for the cell-extrinsic function of CTLA-4. *Science*, 2011, Vol. 332, no. 6029, pp. 600-603.
61. Reichert J.M. Antibodies to watch in 2015. *MAbs*, 2015, Vol. 7, no. 1, pp. 1-8.
62. Ribas A. Clinical development of the antiCTLA-4 antibody tremelimumab. *Semin. Oncol.*, 2010, Vol. 37, pp. 450-454.
63. Ribas A., Kefford R., Marshall M.A., Punt C.J., Haanen J.B., Marmol M., Garbe C., Gogas H., Schachter J., Linette G., Lorigan P., Kendra K.L., Maio M., Trefzer U., Smylie M., McArthur G.A., Dreno B., Nathan P.D., Mackiewicz J., Kirkwood J.M., Gomez-Navarro J., Huang B., Pavlov D., Hauschild A. Phase III randomized clinical trial comparing tremelimumab with standard-of-care chemotherapy in patients with advanced melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2013, Vol. 31, no. 5, pp. 616-622.
64. Robert C., Ribas A., Wolchok J.D., Hodi F.S., Hamid O., Kefford R., Weber J.S., Joshua A.M., Hwu W.J., Gangadhar T.C., Patnaik A., Dronca R., Zarour H., Joseph R.W., Boasberg P., Chmielowski B., Mateus C., Postow M.A., Gergich K., Ellassais-Schaap J., Li X.N., Iannone R., Ebbinghaus S.W., Kang S.P., Daud A. Anti-programmed-death-receptor-1 treatment with pembrolizumab in ipilimumab-refractory advanced melanoma: a randomised dose-comparison cohort of a phase 1 trial. *Lancet.*, 2014, Vol. 384, no. 9948, pp. 1109-1117.

65. Romano E., Kusio-Kobialka M., Foukas P.G., Baumgaertner P., Meyer C., Ballabeni P., Michielin O., Weide B., Romero P., Speiser D.E. Ipilimumab-dependent cell-mediated cytotoxicity of regulatory T cells *ex vivo* by nonclassical monocytes in melanoma patients. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2015, Vol. 112, no. 19, pp. 6140-6145.
66. Rudd C.E. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 2, pp. 153-160.
67. Salama A.D., Chitnis T., Imitola J., Ansari M.J., Akiba H., Tushima F., Azuma M., Yagita H., Sayegh M.H., Khoury S.J. Critical role of the programmed death-1 (PD-1) pathway in regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 1, pp. 71-78.
68. Salceda S., Tang T., Kmet M., Munteanu A., Ghosh M., Macina R., Liu W., Pilkington G., Papkoff J. The immunomodulatory protein B7-H4 is overexpressed in breast and ovarian cancers and promotes epithelial cell transformation. *Exp. Cell Res.*, 2005, Vol. 306, no. 1, pp. 128-141.
69. Schneider H., Smith X., Liu H., Bismuth G., Rudd C.E. CTLA-4 disrupts ZAP70 microcluster formation with reduced T cell/APC dwell times and calcium mobilization. *Eur. J. Immunol.*, 2008, Vol. 38, no. 1, pp. 40-47.
70. Schneider H., Martin M., Agarraberes F.A., Yin L., Rapoport I., Kirchhausen T., Rudd C.E. Cytolytic T lymphocyte-associated antigen-4 and the TCR zeta/CD3 complex, but not CD28, interact with clathrin adaptor complexes AP-1 and AP-2. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 163, no. 4, pp. 1868-1879.
71. Schneider H., Schwartzberg P.L., Rudd C.E. Resting lymphocyte kinase (Rlk/Txk) phosphorylates the YVKM motif and regulates PI 3-kinase binding to T-cell antigen CTLA-4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1998, Vol. 252, no. 1, pp. 14-19.
72. Shin D.S., Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr. Opin. Immunol.*, 2015, Vol. 33C, pp. 23-35.
73. Sim G.C., Martin-Orozco N., Jin L., Yang Y., Wu S., Washington E., Sanders D., Lacey C., Wang Y., Vence L., Hwu P., Radvanyi L. IL-2 therapy promotes suppressive ICOS⁺ Treg expansion in melanoma patients. *J. Clin. Invest.*, 2014, Vol. 124, no. 1, pp. 99-110.
74. Takahashi T., Tagami T., Yamazaki S., Uede T., Shimizu J., Sakaguchi N., Mak T.W., Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 2, pp. 303-310.
75. Tamura H., Dan K., Tamada K., Nakamura K., Shioi Y., Hyodo H., Wang S.D., Dong H., Chen L., Ogata K. Expression of functional B7-H2 and B7.2 costimulatory molecules and their prognostic implications in de novo acute myeloid leukemia. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 16, pp. 5708-5717.
76. Thompson R.H., Kwon E.D. Significance of B7-H1 overexpression in kidney cancer. *Clin. Genitourin. Cancer*, 2006, Vol. 5, no. 3, pp. 206-211.
77. Topalian S.L., Sznol M., McDermott D.F., Kluger H.M., Carvajal R.D., Sharfman W.H., Brahmer J.R., Lawrence D.P., Atkins M.B., Powderly J.D., Leming P.D., Lipson E.J., Puzanov I., Smith D.C., Taube J.M., Wigginton J.M., Kollia G.D., Gupta A., Pardoll D.M., Sosman J.A., Hodi F.S. Survival, Durable Tumor Remission, and Long-Term Safety in Patients With Advanced Melanoma Receiving Nivolumab. *J. Clin. Oncol.*, 2014, Vol. 32, no. 10, pp. 1020-1030.
78. Tringler B., Zhuo S., Pilkington G., Torkko K.C., Singh M., Lucia M.S., Heinz D.E., Papkoff J., Shroyer K.R. B7-h4 is highly expressed in ductal and lobular breast cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 5, pp. 1842-1848.
79. Tseng S.Y., Otsuji M., Gorski K., Huang X., Slansky J.E., Pai S.L., Shalabi A., Shin T., Pardoll D.M., Tsuchiya H. B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 193, no. 7, pp. 839-846.
80. Tumeo P.C., Harview C.L., Yearley J.H., Shintaku I.P., Taylor E.J., Robert L., Chmielowski B., Spasic M., Henry G., Ciobanu V., West A.N., Carmona M., Kivork C., Seja E., Cherry G., Gutierrez A.J., Grogan T.R., Mateus C., Tomasic G., Glaspy J.A., Emerson R.O., Robins H., Pierce R.H., Elashoff D.A., Robert C., Ribas A. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature*, 2014, Vol. 515 (7528), pp. 568-571.
81. Valk E., Leung R., Kang H., Kaneko K., Rudd C.E., Schneider H. T cell receptor-interacting molecule acts as a chaperone to modulate surface expression of the CTLA-4 coreceptor. *Immunity*, 2006, Vol. 25, no. 5, pp. 807-821.
82. van der Merwe P.A., Bodian D.L., Daenke S., Linsley P., Davis S.J. CD80 (B7-1) binds both CD28 and CTLA-4 with a low affinity and very fast kinetics. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 185, no. 3, pp. 393-403.
83. Weber J.S., Kähler K.C., Hauschild A. Management of immune-related adverse events and kinetics of response with ipilimumab. *J. Clin. Oncol.* 2012, Vol. 30, no. 21, pp. 2691-2697.
84. Wiendl H. Human muscle cells express a B7-related molecule, B7-H1, with strong negative immune regulatory potential: a novel mechanism of counterbalancing the immune attack in idiopathic inflammatory myopathies. *FASEB J.*, 2003, Vol. 17, no. 13, pp. 1892-1894.
85. Wintterle S., Schreiner B., Mitsdoerffer M., Schneider D., Chen L., Meyermann R., Weller M., Wiendl H. Expression of the B7-related molecule B7-H1 by glioma cells: a potential mechanism of immune paralysis. *Cancer Res.*, 2003, Vol. 63, no. 21, pp. 7462-7467.
86. Wolchok J.D., Neyns B., Linette G., Negrier S., Lutzky J., Thomas L., Waterfield W., Schadendorf D., Smylie M., Guthrie T.Jr., Grob J.J., Chesney J., Chin K., Chen K., Hoos A., O'Day S.J., Lebbé C. Ipilimumab monotherapy

in patients with pretreated advanced melanoma: a randomised, double-blind, multicentre, phase 2, dose-ranging study. *Lancet. Oncol.*, 2010, Vol. 11, no. 2, pp. 155-164.

87. Wolchok J.D., Kluger H., Callahan M.K., Postow M.A., Rizvi N.A., Lesokhin A.M., Segal N.H., Ariyan C.E., Gordon R.A., Reed K., Burke M.M., Caldwell A., Kronenberg S.A., Agunwamba B.U., Zhang X., Lowy I., Inzunza H.D., Feely W., Horak C.E., Hong Q., Korman A.J., Wigginton J.M., Gupta A., Sznol M. Nivolumab plus ipilimumab in advanced melanoma. *N. Engl. J. Med.*, 2013, Vol. 369, no. 2, pp. 122-133.

88. Yamazaki T., Akiba H., Koyanagi A., Azuma M., Yagita H., Okumura K. Blockade of B7-H1 on macrophages suppresses CD4⁺ T cell proliferation by augmenting IFN-gamma-induced nitric oxide production. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 3, pp. 1586-1592.

89. Zang X., Thompson R.H., Al-Ahmadie H.A., Serio A.M., Reuter V.E., Eastham J.A., Scardino P.T., Sharma P., Allison J.P. B7-H3 and B7x are highly expressed in human prostate cancer and associated with disease spread and poor outcome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2007, Vol. 104, no. 49, pp. 19458-19463.

90. Zhu C., Anderson A.C., Schubart A., Xiong H., Imitola J., Khoury S.J., Zheng X.X., Strom T.B., Kuchroo V.K. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 12, pp. 1245-1252.

Авторы:

Боголюбова А.В. — младший научный сотрудник, лаборатория молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии, биологический факультет, ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Ефимов Г.А. — к.б.н., заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии, ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ; лаборатория молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

Друцкая М.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярных механизмов иммунитета, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

Недоспасов С.А. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярных механизмов иммунитета ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии, биологический факультет, ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Authors:

Bogolyubova A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Efimov G.A., PhD (Biology), Head, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation; Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Drutskaya M.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nedospasov S.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Molecular Mechanisms of Immunity, Engelhardt Institute of Molecular Biology of Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Поступила 10.06.2015
Принята к печати 30.06.2015

Received 10.06.2015
Accepted 30.06.2015

АЛЛЕРГЕН-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ИММУНОТЕРАПИЯ: ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ ВАКЦИНЫ ДЛЯ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Федоров А.С.¹, Литвинова Л.С.¹, Бут-Гусаим В.И.¹, Литвиненко С.Н.²

¹ Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград, Россия

² Калининградская областная клиническая больница, г. Калининград, Россия

Резюме. Наиболее эффективным методом лечения аллергии является аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ), которая заключается в введении малых доз антигена, ответственного за развитие состояния у конкретного пациента. При этом происходит десенсибилизация организма к этому антигену. История применения АСИТ насчитывает более 100 лет, и за это время накоплена огромная доказательная база по использованию метода в клинической практике. Применение АСИТ приводит к уменьшению симптомов и потребности в лечении и, кроме того, имеет потенциал для долгосрочного клинического эффекта, предотвращая развитие аллергии и ее симптомов. Лечение действует на основные иммунологические механизмы, ответственные за развитие клинической симптоматики. АСИТ – противовоспалительное, патогенетическое и профилактическое лечение аллергических заболеваний дыхательных путей. В обзоре проанализированы результаты важнейших клинических исследований применения АСИТ для лечения аллергических заболеваний органов дыхания (аллергический ринит и бронхиальная астма). Рассматриваются различные схемы проведения АСИТ, различные ее варианты (инъекционная и сублингвальная АСИТ), вопросы выбора препарата для АСИТ из имеющихся на сегодняшний день на фармацевтическом рынке, критерии отбора пациентов и вопросы использования современных достижений молекулярной алергодиагностики (картирования аллергенной сенсibilизации пациента на молекулярном уровне) для их оптимизации. Рассмотрен вопрос об иммунологических механизмах АСИТ, имеющиеся сведения о которых на сегодняшний день достаточно противоречивы. Эффект АСИТ реализуется через следующие основные иммунологические механизмы: подавление увеличения концентрации эозинофилов, уменьшение продолжительности фазы замедленной гиперчувствительности, также с помощью инициации и поддержания перехода от Th2- к Th1-подобному иммунологическому ответу. Регуляторные Т-клетки играют основную роль в иммунологической реализации механизма АСИТ, они оказывают значительное влияние на подавление Th2-ответа. Одним из механизмов, с помощью которого это происходит, является увеличение производства специфических антител IgG, в первую очередь, подтипа IgG4. Смещение баланса между IgE и IgG4 в сторону продукции IgG4 считается на сегодняшний день принципиально важным условием для успешной АСИТ. Доказано, что аллерген-специфические IgG4 антитела против IgE сохраняются после прекращения лечения и могут обеспечить долгосрочную клиническую толерантность. Рассмотрены перспективы создания новых форм и разновидностей лекарственных препаратов для АСИТ. До клинической практики на настоящий момент дошли две группы препаратов для АСИТ: аллергены и алергоиды (аллергены, химически модифицированные путем обработки

Адрес для переписки:

Федоров Александр Станиславович
Балтийский федеральный университет имени И. Канта
198260, Россия, Санкт-Петербург, ул. Стойкости, 2/11,
кв. 65.
Тел.: 8 (952) 057-94-65.
E-mail: fedorowww@list.ru

Address for correspondence:

Fedorov Alexander S.
I. Kant Baltic Federal University
198260, Russian Federation, St. Petersburg, Stojkosti str., 2/11,
apt 65.
Phone: 7 (952) 057-94-65.
E-mail: fedorowww@list.ru

Образец цитирования:

А.С. Федоров, Литвинова Л.С., В.И. Бут-Гусаим,
С.Н. Литвиненко, «Аллерген-специфическая иммунотерапия:
терапевтические вакцины для аллергических заболеваний»
// Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 407-422.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-407-422

© Федоров А.С. и соавт., 2015

For citation:

A.S. Fedorov, L.S. Litvinova, V.I. But-Gusaim, S.N. Litvinenko,
“Allergen-specific immunotherapy: vaccines for allergic diseases”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2015, Vol. 17, no. 5, pp. 407-422.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-407-422

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-407-422>

формальдегидом с целью повышения их иммуногенности и снижения частоты побочных аллергических реакций, возникающих при их применении). Отдельно рассматриваются иммунологические механизмы СЛИТ (сублингвальной иммунотерапии). СЛИТ является на сегодняшний день наиболее безопасным и перспективным вариантом АСИТ, ее применение наиболее целесообразно в педиатрической практике.

Ключевые слова: аллергические заболевания, аллерген-специфическая иммунотерапия, сублингвальная иммунотерапия, аллерговакцины, аллергокомпоненты, мажорные и минорные аллергены

ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY: VACCINES FOR ALLERGIC DISEASES

Fedorov A.S.^a, Litvinova L.S.^a, But-Gusaim V.I.^a, Litvinenko S.N.^b

^a I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

^b Kaliningrad Regional Clinical Hospital, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Allergen-specific immunotherapy (ASIT) is the most effective method of allergy treatment which consists of exposure to small doses of antigen responsible for development of allergic condition in the particular patient. Therefore, one may achieve desensitization to this antigen. The history of ASIT application lasts for more than 100 years, and, over this time, huge clinical evidence for the usage of the method has been accumulated.

Use of ASIT causes reduction of allergy symptoms and treatment needs and, moreover, it has the potential for long-term clinical benefit, by preventing the development of allergy and its symptoms. The treatment affects basic immunological mechanisms responsible for the development of clinical symptoms. ASIT is an anti-inflammatory, pathogenetic and prophylactic treatment of allergic airway disease. The review considers the results of major clinical trials of the ASIT applications for treatment of allergic diseases of the respiratory system (allergic rhinitis and bronchial asthma). Various schemes of ASIT are discussed including its different variants (injectable and sublingual ASIT), the issues of preparation choice for ASIT from those currently available on the pharmaceutical market, patient selection criteria, and the issues of modern molecular allergodiagnostic (allergic sensitization mapping of the patient at molecular level), in order to optimize them. Immunological mechanisms of ASIT are also considered, since appropriate views are rather controversial. The ASIT effect is mediated through the following basic immunological mechanisms: the suppressed increase of the eosinophil concentrations, reduced duration of the delayed hypersensitivity phase, as well as initiation and maintenance of the Th2-to-Th1-like immune response transition. Regulatory T-cells play a major role in implementation of the immunological mechanism in ASIT, they have a significant impact on the Th2 response suppression. Such suppression may proceed *via* increased production of specific IgG antibodies, primarily of IgG4 subtype. The shift of balance between IgE and IgG4 towards IgG4 production is now considered a fundamental condition for successful ASIT. It has been proven that the allergen-specific IgG4 antibodies against IgE persist after discontinuation of the treatment and can provide long-term clinical tolerance. Modern perspectives for development of new forms and species of preparations for ASIT are also reviewed. Two groups of drugs for ASIT have been adopted for clinical practice until now, i.e., allergens and allergoids (allergens chemically modified by treatment with formaldehyde, in order to enhance their immunogenicity and to reduce the incidence of adverse allergic reactions associated with their application). Immunological mechanisms of SLIT (sublingual immunotherapy) are subjected to special consideration. So far, SLIT is the safest and most promising option of ASIT today, its usage is most expedient in pediatric practice.

Keywords: allergic diseases, allergen-specific immunotherapy, sublingual immunotherapy, allergovaccine, allergen components, major allergens, minor allergen

Суть подхода и его место в системе противоаллергической терапии

Аллерген-специфическая иммунотерапия (АСИТ) является способом лечения аллергических заболеваний с IgE опосредованным механизмом развития. Суть его состоит в том, что в организм пациента вводится последовательно аллерген, к которому выявлена гиперчувствительность с помощью кожных тестов или ла-

бораторных исследований, и который признан ответственным за клинические проявления аллергического заболевания. Так у пациента вырабатывается толерантность к естественной экспозиции данного аллергена – специфическая гипосенсибилизация. Этот способ терапии приводит к иммунологически опосредованному снижению чувствительности к действию аллергена. АСИТ проводится только аллергенами, ответ-

ственными за развитие клинических проявлений аллергической патологии у данного пациента (при наличии у больного поливалентной сенсибилизации) [126]. Из-за сходства самого процесса с вакцинацией (при проведении подкожной АСИТ) методику называют также аллерговакцинацией.

Из всего терапевтического арсенала для лечения аллергических заболеваний АСИТ является единственным способом лечения аллергии, способным повлиять непосредственно на ход развития заболевания и «десенсибилизировать» пациента (в различной степени вплоть до полного исчезновения клинических симптомов). При этом в период обострения аллергического заболевания изолированное назначение АСИТ не обосновано. В некоторых случаях АСИТ используется в сочетании с традиционным симптоматическим лечением (антигистаминные препараты, глюкокортикоиды и другие препараты, используемые для непосредственного воздействия на симптомы, имеющиеся у больного в настоящий момент).

За последние годы был опубликован целый ряд документов, обобщающих многочисленные клинические исследования АСИТ и содержащих практические рекомендации для врачей-клиницистов. Наиболее важными из них являются следующие:

- рекомендации ВОЗ [132, 122];
- рекомендации Европейской академии аллергологии и клинической иммунологии [7];
- Международная согласительная конференция по астме [62];

- Глобальная стратегия лечения и профилактики астмы (GINA) [57];
- рекомендации Британского общества аллергии и клинической иммунологии [55];
- Международная согласительная конференция по аллергическому риниту Всемирной аллергологической организации [25];
- рекомендации Американской коллегии аллергии, астмы и иммунологии [88];
- рекомендации международной группы экспертов ARIA.

Изучив эти документы, можно лучше понять показания к АСИТ и получить данные об ее эффективности и безопасности. На основе мета-анализа наиболее важных клинических исследований АСИТ международная группа экспертов ARIA проанализировала доказательства эффективности метода при лечении различных аллергических заболеваниях. При этом использовались следующие критерии степени доказательства этих исследований (табл. 1).

На основе критериев, изложенных выше, была разработана таблица экспериментальных доказательств эффективности АСИТ (табл. 2).

Группы препаратов аллергенов, применяемых для проведения АСИТ

Для проведения АСИТ применяются следующие группы аллергенов [5]:

- немодифицированные вакцины;
- модифицированные (химическим способом) вакцины – аллергоиды;
- депо-вакцины (адсорбированные на различных переносчиках);
- рекомбинантные аллергены.

ТАБЛИЦА 1. КРИТЕРИИ СТЕПЕНИ ДОКАЗАТЕЛЬНОСТИ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Ia	Метаанализ рандомизированных контролируемых исследований
Ib	Анализ, в котором присутствует как минимум одно рандомизированное контролируемое исследование
IIa	Анализ, в котором присутствует как минимум одно контролируемое исследование
IIb	Анализ на базе исследований, основанных на других экспериментальных схемах
III	Анализ на базе неэкспериментальных исследований (описания клинических случаев)
IV	Анализ на базе заключения экспертов и авторитетных организаций

ТАБЛИЦА 2. ЭФФЕКТИВНОСТЬ АСИТ ПО РЕЗУЛЬТАТАМ РАЗЛИЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

	Подкожная АСИТ		Сублингвальная АСИТ	
	ARIA 2001	ARIA 2008	ARIA 2001	ARIA 2008
Эффективность при лечении ринита у взрослых	Ib	Ib	Ib	Ia
Эффективность при лечении астмы у взрослых	Ia	Ia	–	Ia
Эффективность при лечении ринита у детей	–	Ib	–	Ia
Долгосрочная эффективность	–	Ib	–	IIa
Предупреждение развития новой сенсибилизации	–	Ib	–	IIa
Предупреждение развития астмы	–	Ib	–	Ib

Модифицированные вакцины и депо-вакцины разработаны с целью повышения эффективности АСИТ и снижения вероятного риска возникновения побочных эффектов в виде различных аллергических реакций. Аллерговакцины могут содержать один или несколько аллергенов. Допускается смешивание в одной аллерговакцине как кросс-реактивных аллергенов (миксты родственных аллергенов пыльцы сорных трав, родственных аллергенов клещей домашней пыли и т.д.), так и аллергенов разных видовых групп при наличии данных об их клинической эффективности и стабильности [87].

Подкожная иммунотерапия

В проведенном метаанализе клинических исследований АСИТ выявлена клиническая эффективность подкожной иммунотерапии у больных бронхиальной астмой [2, 3] и аллергическим ринитом [24].

Проблема назначения подкожной АСИТ заключается в ее дозозависимом балансе между эффективностью и безопасностью. Подкожная АСИТ неэффективна при применении низких доз [60, 125], использование же высокодозной инъекционной АСИТ часто сопряжено с риском тяжелых системных аллергических реакций [125]. В связи с этим разработаны оптимальные схемы дозирования аллергенов при инъекционной АСИТ (доза аллергена измеряется в биологических единицах или единицах массы [132]). Оптимальной является такая доза аллергена, при применении которой возникает достаточный клинический эффект при отсутствии серьезных побочных эффектов [36]. Оптимальными дозами для большинства аллерговакцин являются дозы от 5 до 20 мкг на инъекцию [126, 132, 17]. Трудности при определении оптимальной дозы аллергена для АСИТ состоят в том, что на практике часто клиническая активность экстрактов аллергенов различных производителей может отличаться за счет особенностей сенсibilизации конкретных пациентов даже в том случае, когда активность этих аллергенов выражена в одних и тех же единицах.

В различных исследованиях была установлена клиническая эффективность АСИТ, проявляющаяся в уменьшение симптомов и снижении потребности в медикаментозном лечении аллергического заболевания: АСИТ аллергенами пыльцы сорных трав и злаков [136, 129, 56, 108], пыльцы березы [11, 15, 136, 137], пыльцы амброзии [78], пыльцы чертополоха [29], пыльцы постенницы (*Parietaria*) [50, 104], аллергенами клещей домашней пыли *D. farinae* и *D. pteronyssinus* [8, 58] и эпидермальным аллергеном кошки [39]. В трех из описанных выше исследований выявилась четкая корреляция клинической эффективности

и дозы аллергена для АСИТ [39, 56, 78]. В одном исследовании было продемонстрировано уменьшение симптомов аллергического ринита после АСИТ рекомбинантными аллергенами пыльцы сорных трав [67]. В ряде исследований отмечено улучшение качества жизни при аллергических заболеваниях в результате проведения АСИТ [30, 56]. Установлено, что необходимо в среднем около 3 лет для получения стойкого длительного эффекта, который сохраняется после окончания АСИТ [31, 39]. Получены данные об эффективности новых форм ультракороткой подкожной АСИТ с использованием монофосфорил липида А [76, 98]. Проводятся клинические исследования CpG-вакцин, но данных об их эффективности и безопасности недостаточно: для подтверждения необходимы дальнейшие клинические исследования [35].

Подкожная АСИТ сопряжена с риском возникновения системных побочных эффектов. Риск серьезных анафилактических реакций при проведении АСИТ по поводу бронхиальной астмы превышает аналогичный риск при назначении АСИТ для лечения аллергического ринита [17, 71, 105, 132]. Во многих исследованиях установлено, что системные побочные эффекты возможны как при применении стандартизированных экстрактов [56], так и при применении алергоидов [30] или рекомбинантных аллергенов [67]. Несмотря на то, что дозы 5-20 мкг главного аллергена оптимальны для большинства аллерговакцин [132], системные побочные эффекты были зафиксированы также и при применении этих доз [56], для более детального изучения этого принципиально важного вопроса требуются дальнейшие клинические исследования.

Назначение пероральных антигистаминных препаратов в стадии наращивания дозы при АСИТ снижает частоту и тяжесть системных побочных реакций [89], уровень доказательности В [123].

Многочисленные двойные слепые плацебо-контролируемые исследования продемонстрировали эффективность подкожной АСИТ. Стоит отметить, что это не всегда означает, что полученные результаты можно использовать в клинической практике, так как исследования специально планируются, а в обычной практике наблюдаются значительные индивидуальные особенности сенсibilизации и иммунологических показателей у разных пациентов, что может обуславливать различную эффективность АСИТ в каждом конкретном случае. Наличие современных высокоэффективных и безопасных фармацевтических средств для лечения аллергических заболеваний (антигистаминные препараты, топические глюкокортикостероиды) требует

тщательной сравнительной оценки возможной пользы фармакотерапии и АСИТ для принятия решения о назначении АСИТ.

Показания к подкожной АСИТ опубликованы в 1998 г. [132] и 2001 г. [17]. Они одинаковые у детей старше 5 лет и взрослых [7, 137] (как и противопоказания).

Подкожная АСИТ может менять естественное течение аллергического заболевания. Эффекты ее носят долговременный характер и сохраняются после прекращения лечения [20, 39, 46, 82]. Подкожная АСИТ при наличии моносенсибилизации у детей может предупреждать расширение спектра сенсибилизации и включение в него новых аллергенов [40], также наблюдается превентивный эффект у больных аллергическим ринитом, заключающийся в профилактике развития у них бронхиальной астмы [81, 90], уровень доказательности стойкого и профилактического эффекта АСИТ относится к категории В [7].

Сублингвальная иммунотерапия

Длительное время эффективность сублингвальной иммунотерапии (СЛИТ) была спорной. СЛИТ не получила широкого распространения в США. В некоторых исследованиях ее эффективность не была подтверждена [85, 111] или оценивалась как сомнительная [54], другие исследования продемонстрировали определенный клинический эффект, но при этом на многие поставленные вопросы не было получено однозначного ответа [34]. СЛИТ как метод лечения аллергических заболеваний впервые стала широко обсуждаться с 1993 года, когда вышел согласительный документ по АСИТ ЕААСИ [73], где было впервые рекомендовано проведение исследований для доказательства эффективности и безопасности СЛИТ. В 1998 г. опубликован согласительный документ ВОЗ по АСИТ [72], куда вошли данные 4 двойных слепых плацебо-контролируемых исследований, которые показали эффективность СЛИТ с проглатыванием у взрослых пациентов с аллергическим ринитом; однако не была доказана эффективность и безопасность у детей. В 2001 г. результаты 10 двойных слепых плацебо-контролируемых исследований показали эффективность и безопасность СЛИТ с проглатыванием у взрослых и детей при сезонном и круглогодичном рините. Результаты этих исследований вошли в международный консенсус по лечению аллергического ринита [19]. В 2006 г. опубликованы стандарты проведения АСИТ ЕААСИ [6], где большое внимание уделено неинъекционным методам АСИТ. Метаанализ 22 двойных слепых плацебо-контролируемых исследований подтвердил эффективность сублингвальной АСИТ в уменьшении симптомов и потребности в фармакотерапии при аллергическом

рините (уровень доказательства клинической эффективности Ia). Метаанализ 25 двойных слепых плацебо-контролируемых исследований СЛИТ при бронхиальной астме показал эффективность метода в отношении редукции симптомов, потребности в медикаментах, улучшении респираторной функции и снижении бронхиальной гиперреактивности (уровень доказательства клинической эффективности Ib) [6, 23].

Cochrane Collaboration провел метаанализ сублингвальной иммунотерапии [133, 135], который показал безопасность и эффективность СЛИТ. Вслед за этим метаанализом был проведен ряд других исследований, подтвердивших его результаты [45, 47, 75]. Также были проведены регистрационные исследования, были получены результаты лечения более 600 пациентов с пылевой сенсибилизацией к злакам, которые убедительно продемонстрировали безопасность и эффективность СЛИТ аллергенами в таблетированной форме [38, 47]. Исследования показали улучшение качества жизни на фоне проведения СЛИТ [107]. Выявлена эффективность СЛИТ при аллергическом рините и бронхиальной астме, сочетающейся с пылевой сенсибилизацией к пыльце деревьев (береза, кипарис, оливковое дерево, постенница), а также при бытовой сенсибилизации к клещам домашней пыли *D. farinae* и *D. pteronyssinus*. Ряд исследований показал эффективность СЛИТ аллергенами клещей домашней пыли *D. farinae* и *D. pteronyssinus* при атопическом дерматите [12], но для дальнейших выводов необходимы новые, более крупные рандомизированные исследования в этом направлении.

Было опубликовано крупное исследование, в котором не была подтверждена эффективность СЛИТ у детей при применении аллергена в относительно низкой дозе [110]. Исследование применения СЛИТ для лечения детей с легкой и средней тяжести бронхиальной астмой при наличии бытовой сенсибилизации к клещам домашней пыли *D. farinae* и *D. pteronyssinus* (при недостаточной эффективности фармакотерапии и создания гипоаллергенных условий быта) продемонстрировало, что СЛИТ не привела к существенному клиническому эффекту, несмотря на значительное уменьшение сенсибилизации к клещам домашней пыли [103]. Эти два исследования необходимо учитывать при рассмотрении метаанализа исследований у детей, показавшего безопасность и эффективность СЛИТ [100]. Был также проведен метаанализ эффективности СЛИТ при бронхиальной астме, в который вошли 25 исследований с общей численностью пациентов 1706 человек [22]. Он показал, что АСИТ вызывает значительное уменьшение симптомов бронхиальной астмы и снижение потребности в проти-

воастматических лекарственных препаратах. Но так как в различных исследованиях, включенных в этот метаанализ, наблюдался очень большой разброс назначаемой для АСИТ дозы аллергена (дозы применявшихся аллергенов отличались в 3-375 раз от кумулятивной дозы аллергенов, используемых для проведения подкожной АСИТ), то определенный вывод сделать не удалось [26]. В нескольких крупных исследованиях, в которых использовались таблетированные формы аллергенов, были получены следующие результаты: СЛИТ неэффективна при использовании низких доз аллергенов, а для достижения клинического эффекта необходима суточная доза Phl р 5, составляющая около 25 мкг, при этом дальнейшее увеличение дозы не приводит к повышению клинической эффективности СЛИТ.

Ряд исследований показал безопасность СЛИТ у взрослых [9, 42]. Были зафиксированы следующие местные побочные эффекты: зуд, отек губ и слизистой оболочки подъязычной области. Данные побочные эффекты наблюдались при применении высоких доз аллергена. Они не вызвали серьезного субъективного дискомфорта у пациентов, не потребовали назначения какого-либо дополнительного медикаментозного лечения или изменения режима СЛИТ, при продолжении терапии они часто прекращались. В отдельных исследованиях были зафиксированы системные реакции (крапивница и приступы бронхоспазма), которые проходили самостоятельно и также не потребовали дополнительного медикаментозного лечения. Отмечена корреляция частоты возникновения побочных эффектов и дозы аллергена для СЛИТ [133]. Были описаны 2 случая анафилактических реакций при проведении СЛИТ, в одном случае применялся аллерген латекса, в другом – микст-аллерговакцина [10, 44].

В ряде исследований проводилась оценка эффективности различных способов АСИТ (подкожной АСИТ и СЛИТ). В одном исследовании принимали участие три группы пациентов (СЛИТ, подкожная АСИТ и плацебо) [84]. Другое исследование являлось открытым [101], отсут-

ствии полноценной информации о дизайне этого исследования не позволяет сделать однозначные выводы. В двойном слепом плацебо-контролируемом исследовании СЛИТ у пациентов с риноконъюнктивитом на фоне сенсibilизации к пыльце березы между группой плацебо и двумя группами, получавшими аллергены, были выявлены значительные различия в симптомах и потребности в лекарствах, но небольшое число пациентов не позволяет подтвердить разницу между двумя группами больных, получавших иммунотерапию [69]. Для дальнейшей сравнительной оценки эффективности различных способов АСИТ (подкожной АСИТ и СЛИТ) необходимы дополнительные исследования [7]. Установлено, что СЛИТ может менять естественное течение аллергического заболевания [41, 95], но для подтверждения этого нужны дальнейшие клинические исследования.

В настоящее время в России для проведения СЛИТ используются 2 принципиально различные группы препаратов аллергенов: аллергены и алергоиды (табл. 3). Алергоиды представляют собой химически модифицированные аллергены и характеризуются относительно низким уровнем IgE-связывающей способности, что способствует снижению частоты риска побочных эффектов АСИТ.

Иммунологические механизмы АСИТ

Механизмы АСИТ можно понять, изучая те изменения в иммунной системе, которые происходят в процессе лечения и после его завершения. В патогенезе аллергических заболеваний основную роль играет подкласс лимфоцитов Т-хелперов второго типа (Th2), которые характеризуются выработкой таких цитокинов, как IL-4, IL-5, IL-13 и многих других [63, 94, 115]. Th2 и цитокины, ими вырабатываемые, ответственны за вовлечение других эффекторных клеток, наиболее важные из которых – эозинофилы, тучные клетки и базофилы, в процесс аллергического воспаления. Th2-клетки играют основную роль в продукции аллерген-специфических IgE, синтезируемых В-клетками. Основные иммунологические механизмы АСИТ включают в себя умень-

ТАБЛИЦА 3. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРЕПАРАТОВ ДЛЯ СЛИТ, ЗАРЕГИСТРИРОВАННЫХ В РОССИИ

Название, производитель	Аллергены («Сева-Фарма», Чехия)	СТАЛОРАЛЬ, ОРАЛЭЙР («Сталлержен», Франция)	LAIS («Лофарма», Италия)
Структура молекул	Полимер	Полимер	Мономер (алергоид)
Стандартизация	Содержание белкового азота (характеризует общее содержание белка в препарате)	Индекс реактивности (характеризует мажорный антиген)	Аллергенная единица (характеризует антигенную детерминанту)
Способ применения	Сублингвально (капли)	Сублингвально (капли, таблетки)	Сублингвально (таблетки)

шение эозинофилии [106], подавление ранней фазы аллергической реакции [129, 130], изменение соотношения Т-хелперов (Th1 и Th2). После первого года терапии значительно возрастает доля «наивных» Т-лимфоцитов (Th0). После второго года АСИТ значительно увеличивался уровень Th1-клеток, которые начинают преобладать над Th2 [49, 59, 127, 134]. Т-регуляторные клетки играют центральную роль в реализации иммунологических эффектов при успешной АСИТ [126]. Один из механизмов, с помощью которого аллерген-специфическая иммунотерапия подавляет иммунологический ответ по аллергическому типу, заключается в повышении выработки специфических IgG, в первую очередь подтипа IgG4. Если рассматривать это в контексте IgE-опосредованных аллергических реакций, то повышение антител класса IgG4 обычно ассоциируется с уменьшением клинической симптоматики. Это происходит, вероятно, из-за аллерген-блокирующего эффекта на уровне тучных клеток и/или на уровне антигенпрезентирующих клеток (предотвращает IgE-опосредованную активацию Т-клеток) [1]. Если продукция антител класса IgE против безвредных при обычных условиях антигенов может вызывать аллергические реакции, то продукция IgG, специфичных для того же антигена, может приводить к тому, что аллерген-специфические IgG выступают в роли антагонистов IgE и блокируют развитие вызываемого ими аллергического воспаления. Поэтому смещение баланса между продукцией антител класса IgE и IgG в сторону IgG является принципиально важным для успешной АСИТ. В ряде исследований было выявлено повышение уровня антител подтипа IgG4 у больных бронхиальной астмой с наличием сенсibilизации к плесневым грибам при проведении АСИТ аллергеном альтернативы [98], а также при проведении АСИТ аллергенами трески, коровьего молока, куриного яйца у больных с пищевой аллергией [21, 77, 99].

Различные IgG4-опосредованные иммунологические эффекты обуславливают в клинической практике снижение симптомов заболевания и потребности в медикаментах:

- подавление высвобождения медиаторов, вызванное непосредственным ингибированием взаимодействия с аллерген-специфическими IgE или опосредованно с помощью ингибирования FcγRIIB and FcγRI [68];

- АСИТ индуцирует подавление высвобождения гистамина из базофилов с помощью IgG [138];

- специфические антитела класса IgG уменьшают концентрацию аллерген-специфических антител класса IgE при связывании с эпитопами

на поверхности аллергена, уменьшая, таким образом, антигенпрезентирующую емкость соответствующих типов клеток [128].

Также исследования продемонстрировали корреляцию снижения симптомов заболевания при аллергическом рините со снижением эозинофилии и экспрессии IL-5 в слизистой оболочке носа [134], повышение продукции интерферона-гамма (IFNγ) [48] во время сезона цветения. АСИТ индуцирует выработку IL-12, которая имеет обратную зависимость от продукции IL-4, а также способствует продукции Th1-лимфоцитами IFNγ, который, в свою очередь, стимулирует выработку В-лимфоцитами антител класса IgG [59]. TGF-β также является медиатором Т-регуляторных клеток, выработка которого индуцируется в результате АСИТ [66]. TGF-β вызывает подавление клеточного ответа по Th2-типу, уменьшая продукцию IL-5 и предотвращая индуцированную экспозицией аллергена эозинофилию и аллергическое воспаление [134]. Важная роль Т-регуляторных клеток в иммунологических механизмах АСИТ продемонстрирована в многочисленных исследованиях [4, 65, 96, 109, 116].

Успешная АСИТ ассоциирована с уменьшением тучных клеток, базофилов и эозинофилов в коже, слизистой носа, бронхов, конъюнктив в ответ на провокацию или естественную экспозицию аллергена. АСИТ приводит к изменению гуморального и клеточного ответа на аллерген, подавляет аллергическое воспаление, аллерген-специфическую и неспецифическую тканевую гиперчувствительность.

Особенности иммунологических механизмов сублингвальной АСИТ

В настоящее время механизмы сублингвальной иммунотерапии до конца не изучены, в целом они сходны с механизмами инъекционной АСИТ, но имеются довольно существенные различия. Считается, что контакт аллергена со слизистой ротовой полости и желудочно-кишечного тракта является залогом успешной иммунотерапии. При сублингвальном приеме аллергена создаются условия для максимально длительной стимуляции иммунной системы желудочно-кишечного тракта за счет длительного контакта аллергена алерговакцин со слизистой оболочкой (около 18-20 часов). Примерно 20% применяемого аллергена в течение 20-40 часов сохраняется в слизистой оболочке полости рта и может связываться с дендритными клетками [13]. Форму иммунного ответа при СЛИТ определяет, в первую очередь, презентация антигена (аллергена алерговакцины), поступившего в ЖКТ. Она имеет ряд особенностей. Дендритные

клетки слизистой оболочки полости рта захватывают аллерген, созревают и мигрируют в регионарные лимфатические узлы, где представляют аллерген Т- и В-лимфоцитам. В регионарных лимфоузлах происходит продукция блокирующих антител и активация Т-лимфоцитов, обладающих супрессивной функцией [80]. На своей мембране дендритная клетка экспрессирует молекулы ICAM-1, LFA-3, выполняющие адгезивные функции, и молекулы CD80/B7-1, CD86/B7-2, CD40, выполняющие костимулирующие функции. Установлено, что при атопии имеется высокий уровень экспрессии рецепторов I типа к Fc-фрагменту иммуноглобулина E (IgE), а также костимулирующих молекул и молекул главного комплекса гистосовместимости HLA на дендритных клетках слизистой оболочки ротовой полости и носоглотки [79]. В результате миграции дендритных клеток в лимфоидные структуры слизистых оболочек и регионарные лимфоузлы, происходит их взаимодействие там с «наивными» лимфоцитами (Th0). Этот путь презентации антигена и определяет в каждом конкретном случае развитие толерантности или иммунитета. В презентации аллергена, поступающего в организм пероральным путем, также участвуют антигенпрезентирующие энтероциты, при активации экспрессирующие молекулы HLA II класса. На их поверхности экспрессируются рецепторы для следующих цитокинов: интерферон-гамма (IFN γ), интерлейкин-4 (IL-4) и IL-17. Также эти клетки сами продуцируют такие цитокины, как интерферон-альфа (IFN α), туморнекротический фактор (TNF), интерлейкины (IL-1, IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18), гемопозитины, хемокины. В результате такой презентации антигена (аллергена алерговакцины) следует преимущественная стимуляция CD8⁺T-клеток, или вырабатываются растворимые супрессорные факторы.

Существует также путь презентации антигена с участием CD1-системы, ее молекулы экспрессируются на антигенпрезентирующих клетках и эпителиальных клетках желудочно-кишечного тракта [116]. Существуют следующие механизмы иммунологической толерантности к аллергену: анергия, делеция или супрессия аллерген-специфических Т-клеток [65, 120]. То, какой механизм будет задействован в каждом конкретном случае, зависит преимущественно от дозы применяемого аллергена. При сублингвальном введении доз аллергена, в 5-20 раз и более превосходящее парентеральные дозы, происходит развитие анергии или делеции реактивных Т-лимфоцитов. Возникновение анергии происходит при отсутствии костимулирующих молекул CD80 и CD86, необходимых для активации эф-

фекторных Т-лимфоцитов, на антигенпрезентирующих клетках. Возникновение делеции клона наступает при взаимодействии CD95-лиганда антигенпрезентирующей клетки с молекулой CD95 на поверхности антигенспецифических Т-лимфоцитов. При высокой концентрации антигена (аллергена) эпителиальные клетки кишечника, дендроциты и макрофаги собственной пластинки и лимфоидных фолликулов начинают продуцировать IL-18, который совместно с IL-12 стимулирует дифференцировку «наивных» Т-лимфоцитов (Th0) в Т-хелперы первого типа (Th1).

При многократном повторном пероральном введении низких доз аллергена происходит развитие супрессии иммунного ответа, осуществляющейся преимущественно регуляторными Т-клетками (Treg-клетки). Сродство рецептора Treg-клеток к антигену значительно выше, чем у других Т-лимфоцитов, в результате чего доза антигенов, необходимая для их активации, в 10-100 раз меньше, чем доза аллергена, требующаяся для активации эффекторных Т-клеток [119].

Результаты определения уровня аллергенспецифических антител класса IgE на фоне проведения СЛИТ оказались противоречивыми. В ряде исследований обнаружено снижение концентрации этих антител в сыворотке крови на фоне СЛИТ пищевыми аллергенами [99, 117]. В других же исследованиях четкой динамики изменения этого показателя не обнаружено: при пищевой сенсibilизации [21, 37], при пыльцевой сенсibilизации к злаковым травам [121], при атопическом дерматите с наличием сенсibilизации к клещам домашней пыли — *Dermatophagoides pteronyssinus* или *Dermatophagoides farinae* [27]. Метаанализ 6 исследований СЛИТ с детальным изучением гуморального иммунного ответа, позволил сделать заключение о постоянном увеличении уровня аллерген-специфических IgG4 [80]. В некоторых других исследованиях СЛИТ была показана дозозависимая индукция аллергенспецифических IgA в сыворотке крови больных [80].

В ряде исследований обнаружено снижение кожной сенсibilизации на фоне СЛИТ при бронхиальной астме [28, 37, 118], пищевой аллергии [77, 99], атопическом дерматите [27]. Также обнаружено снижение гиперреактивности бронхов, вызванной воздействием причинного аллергена, у больных бронхиальной астмой при проведении СЛИТ [28, 37, 118]. При этом ряд исследований не показал изменения уровня сенсibilизации у больных с пыльцевой аллергией на фоне СЛИТ [121].

Установлено, что при лечении бронхиальной астмы в реализации эффекта СЛИТ участвуют неиммунологические механизмы за счет повышения неспецифической абзимной активности иммуноглобулинов. Возможно появление «аллерген-специфических» абзимов [18]. Мукозальная система иммунитета обладает способностью супрессорных Т-лимфоцитов и IgA-плазмочитов мигрировать в лимфоидную ткань, которая ассоциирована со слизистыми оболочками всех локализаций, из кишечника, что определяет формирование толерантности к антигену (как местной, так и системной). Влияние СЛИТ на местный иммунный ответ слизистой желудочно-кишечного тракта на сегодняшний день практически не изучено. В исследованиях были выявлены следующие изменения мукозального иммунитета на фоне СЛИТ: угнетение экспрессии ICAM-1 (молекулы адгезии) на назальном и конъюнктивальном эпителии [79, 91], снижение в слюне и сыворотке крови уровня эозинофильного катионного белка [19, 72], снижение уровней IL-10, TGF- β , IL-13 [6, 23, 79]. Данные результаты не получили однозначной трактовки, необходимо учитывать их при анализе механизмов действия СЛИТ на местную иммунную систему желудочно-кишечного тракта.

Следует особо остановиться на алергоидах LAIS – единственных доступных на сегодняшний день алергоидов для сублингвального применения. Это алергоиды, который получают путем химической модификации экстракта алергенов циановокислым калием (KCNO), взаимодействующим с радикалами лизина. Эта модификация придает алергенам особые отличия, тем самым делая их подходящими для сублингвального применения. LAIS-сублингвальная иммунотерапия приводит к следующим иммунологическим изменениям: подавление Th2-ответа, снижение уровней алерген-специфических IgE и индукция регуляторных Т-клеток, продуцирующих IL-10 и интерферон-гамма (IFN γ). Кроме того, выявлена корреляция СЛИТ алергоидами LAIS с ускорением индукционных схем. Двойные слепые рандомизированные плацебо-контролируемые клинические исследования показали эффективность применения LAIS, выражавшуюся в следующем: снижение общих и индивидуальных симптомов, а также лекарственной зависимости у пациентов с алергическим ринитом и/или астмой. В отдельных рандомизированных клинических исследованиях наблюдалось снижение гиперреактивности бронхов. Все результаты клинических исследований коррелируют с противовоспалительными эффектами [83].

Молекулярная алергодиагностика и прогнозирование эффективности АСИТ

Молекулярная алергодиагностика (МА) является удобным инструментом для разделения истинной сенсibilизации и перекрестных реакций у полисенсibilизированных пациентов в случае, когда традиционных диагностических тестов и данных истории болезни недостаточно для определения значимых алергенов для АСИТ. МА – это подход, используемый для молекулярного картирования алергенной сенсibilизации пациента с применением вместо экстрактов алергенов очищенных алергенов натурального происхождения или алергокомпонентов (рекомбинантных алергенных молекул).

С момента внедрения в лабораторную диагностику МА постоянно увеличивает свою долю в ежедневной лабораторной практике – на сегодняшний день более 130 алергенных молекул для алерген-специфического IgE-тестирования *in vitro* (asIgE) доступны для коммерческих заказов. МА позволяет повысить точность диагноза и прогноза при алергии и играет важную роль в трех ключевых аспектах алергодиагностики:

- 1) дифференциации истинной сенсibilизации и перекрестной реактивности у полисенсibilизированных пациентов, что улучшает, таким образом, выявление причинных алергенов;
- 2) оценки, в отдельных случаях, риска развития острых системных реакций вместо слабых и местных при пищевой алергии, что уменьшает, таким образом, необоснованное волнение пациента и необходимость проведения пищевых провокационных тестов,
- 3) выявление пациентов и причинных алергенов для алерген-специфической иммунотерапии (АСИТ).

В настоящее время доступны стандартные продукты для проведения *in vivo* алерготестов, основанные на экстрактах алергенов, представляющих собой природные смеси алергенных и неалергенных молекул, не стандартизованные по составу главных и минорных компонентов. Многие биологические источники содержат высокоактивные кросс-реагирующие алергокомпоненты, например, профилин, который представлен с широкой вариабельностью в пыльце растений и растительных пищевых продуктах. Сенсibilизация вследствие воздействия таких паналергенов служит причиной положительных результатов тестов (серопозитивности) к большому количеству экстрактов алергенов. Решение о назначении АСИТ должно быть основано не только на доступных в настоящее время препаратах экстрактов алергенов, но и верифици-

ровано в тестах со специфическими маркерами — алергокомпонентами. Не исключено, что уже в ближайшем будущем станет возможным проведение высокоспецифичной иммунотерапии, когда появятся новые терапевтические препараты, основанные на рекомбинантных алергокомпонентах.

Учитывая, что АСИТ — это дорогостоящее лечение, которое проводится обычно продолжительное время (в течение 3-5 лет), правильный диагноз, выбор действительно подходящих пациентов и определение алергенов (первичных сенсibilизаторов) являются особенно важными для оптимального и экономичного контроля за состоянием пациента. Парадигмой является «специфичность» иммунотерапии алергеном — это значит, что иммунотерапия изменяет иммунный ответ против алергена, которым была проведена вакцинация. В итоге для назначения АСИТ необходим точный этиологический диагноз, при котором алерген, вызывающий клинические симптомы, должен быть однозначно идентифицирован. В случае некоторых пациентов для определения причинного алергена достаточно подробной истории болезни и традиционных IgE-тестов на основе экстрактов алергенов [41]. Такая ситуация справедлива прежде всего для алергии на растения с четко определенным периодом цветения, который минимально перекрывается с периодами цветения других растений или другими источниками алергенов. С другой стороны, сложность диагноза возрастает, когда у пациента наблюдается полисенсibilизация, выявляемая традиционными диагностическими тестами на основе экстрактов алергенов, а данных истории болезни недостаточно для точного определения природы сенсibilизации. Такая ситуация может наблюдаться у относительно большого количества пациентов [32, 33, 74, 86, 95, 112, 131].

Использование рекомбинантных или очищенных алергенов поможет разграничить первичную сенсibilизацию и перекрестную реактивность. Более того, большинство коммерческих экстрактов алергенов для АСИТ стандартизованы по мажорным алергенам, но содержат лишь минимальные или переменные количества минорных алергенов [51, 52]. Таким образом, пациенты с сенсibilизацией только к минорным алергенам с большой долей вероятности не получают достаточное количество алергена, необходимое для эффективной АСИТ. В недавних исследованиях было показано, что у пациентов, проходивших двухлетний курс АСИТ пылью трав или березы, результат терапии был более удовлетворительным при сенсibilизации к мажорным алергенам березы или трав по сравнению с пациентами, сенсibilизированными

только минорными, перекрестно реактивными алергенами [79].

У полисенсibilизированных пациентов наиболее значимые алергены, с которыми назначается АСИТ, более точно определяются с помощью МА. В недавних исследованиях было продемонстрировано, что использование МА корректировало назначение АСИТ по сравнению с использованием кожных прик-тестов более чем у 50% пациентов. Такие данные указывают на то, что для полисенсibilизированных пациентов существует риск назначения некорректной АСИТ.

Заключение

АСИТ — единственный вид терапии алергических заболеваний, который затрагивает основные патогенетические механизмы их развития и вызывает изменения в иммунной системе, оказывающие положительное влияние на долгосрочный прогноз алергических заболеваний. АСИТ была предложена в 1911 г. для лечения сезонного алергического ринита (Noon и Freeman) [91]. За более чем сто лет клинического применения метод стал объектом многочисленных клинических исследований, в которых изучались различные виды и модификации АСИТ. В соответствии с результатами этих исследований АСИТ способна предотвратить развитие бронхиальной астмы у больных с алергическим ринитом, а также дает возможность уменьшить симптомы бронхиальной астмы и добиться над ней лучшего контроля. АСИТ также позволяет предотвратить развитие сенсibilизации к новым группам алергенов, что может быть подтверждено как с помощью прик-тестов, так и с помощью определения IgE специфических в сыворотке крови лабораторными методами. Клинические исследования продемонстрировали также, что при длительном наблюдении за больными, получавшими АСИТ современными стандартизированными экстрактами алергенов, выявлен как долговременный стойкий клинический эффект спустя продолжительное время после прекращения АСИТ, так и превентивный эффект относительно развития бронхиальной астмы у детей с сезонным алергическим риноконъюнктивитом. Современные достижения молекулярной алергодиагностики позволяют оптимизировать отбор пациентов для АСИТ с помощью картирования алергенной сенсibilизации на молекулярном уровне и выявления перекрестно-реагирующих алергокомпонентов, снижающих эффективность АСИТ. В данной области необходимы дальнейшие клинические исследования, так как доказательная база по молекулярной алергодиагностике на сегодняшний день невелика.

Список литературы / References

1. Aalberse R.C., Stapel S.O., Schuurman J., Rispens T. Immunoglobulin G4: an odd antibody. *Clin. Exp. Allergy*, 2009, Vol. 39, pp. 469-477.
2. Abramson M., Puy R., Weiner J. Immunotherapy in asthma: an updated systematic review. *Allergy*, 1999, Vol. 54, no. 10, pp. 1022-1041
3. Abramson M.J., Puy R.M., Weiner J.M. Allergen immunotherapy for asthma. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2003, Vol. 4, CD001186.
4. Akdis C.A., Akdis M. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, no. 1, pp. 18-27
5. Allergen products (Producta allergenica). European Pharmacopeia, 1997, pp. 1063-1068.
6. Alvarez-Cuesta E., Bousquet J. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, Suppl. 82.
7. Alvarez-Cuesta E., Bousquet J., Canonica G.W., Durham S.R., Malling H.J., Valovirta E. Standards for practical allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, Suppl. 82, pp. 1-20.
8. Ameal A., Vega-Chicote J.M., Fernandez S., Miranda A., Carmona M.J., Rondon M.C. Double-blind and placebo-controlled study to assess efficacy and safety of a modified allergen extract of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic asthma. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 9, pp. 43-83.
9. Andre C., Vatrinet C., Galvain S., Carat F., Sicard H. Safety of sublingual-swallow immunotherapy in children and adults. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, Vol. 121, no. 3, pp. 229-234.
10. Antico A., Pagani M., Crema A. Anaphylaxis by latex sublingual immunotherapy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 10, pp. 1236-1237.
11. Arvidsson M.B., Lowhagen O., Rak S. Effect of 2-year placebo-controlled immunotherapy on airway symptoms and medication in patients with birch pollen allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 109, no. 5, pp. 777-783.
12. Bae J.M., Choi Y.Y., Park C.O., Chung K.Y., Lee K.H. Efficacy of allergen-specific immunotherapy for atopic dermatitis: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2013, Vol. 132, no. 1, pp. 110-117
13. Bagnasco M. Absorption and distribution kinetics of the major *Parietaria judaica* allergen (Par j1) administered by noninjectable routes in healthy human beings. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, Vol. 100, no. 1, pp. 122-129
14. Baldo B.A. Standardization of allergens. Examination of existing procedures and the likely impact of new techniques on the quality control of extracts. *Allergy*, 1983, Vol. 38, no. 8, pp. 535-546.
15. Bodtger U., Poulsen L.K., Jacobi H.H., Malling H.J. The safety and efficacy of subcutaneous birch pollen immunotherapy – a one-year, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy*, 2002, Vol. 57, no. 4, pp. 297-305.
16. Bousquet J., Demoly P. Specific immunotherapy – an optimistic future. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 10, pp. 1155-1158.
17. Bousquet J., Demoly P., Michel F.B. Specific immunotherapy in rhinitis and asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2001; Vol. 87, no. 1, Suppl. 1, pp. 38-42
18. Bousquet J., Lockey R., Malling H. WHO Position Paper. Allergen Immunotherapy: Therapeutic Vaccines for allergic diseases. *Allergy*, 1998, Vol. 53, Suppl. 54.
19. Bousquet J., Van Cauwenberge N. Khaltaev and the Workshop Expert Panel. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA). *Allergy*, 2002, Vol. 57, no. 9, pp. 841-845.
20. Bozek A., Gawlik R., Jarzab J. (2014) The Prevention of New Sensitizations by Specific Immunotherapy: A Long-Term Observational Case Control Study. *J. Allergy Ther.*, Vol. 5, p. 182.
21. Buchanan A.D., Green T.D., Jones S.M. Egg oral immunotherapy in nonanaphylactic children with egg allergy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, no. 1, pp. 270-271.
22. Calamita Z., Saconato H., Pela A.B., Atallah A.N. Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: systematic review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 10, pp. 1162-1172.
23. Calamita Z., Saconato H., Pela A.B., Atallah A.N. Efficacy of sublingual immunotherapy in asthma: review of randomized-clinical trials using the Cochrane Collaboration method. *Allergy*, 2006, Vol. 61, pp. 1162-1172
24. Calderon M., Alves B., Jacobson M., Hurwitz B., Sheikh A., Durham S. Allergen injection immunotherapy for seasonal allergic rhinitis. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2007, Vol. 1, CD001936.
25. Canonica G.W., Baena-Cagnani C.E., Bousquet J., Bousquet P.J., Lockey R.F., Malling H.J. Recommendations for standardization of clinical trials with Allergen Specific Immunotherapy for respiratory allergy. A statement of a World Allergy Organization (WAO) taskforce. *Allergy*, 2007, Vol. 62, no. 3, pp. 317-324
26. Canonica G.W., Passalacqua G. Noninjection routes for immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 111, no. 3, pp. 437-448; quiz 49.
27. Choi J.S., Ryu H.R., Yoon C.H., Kim J.H., Baek J.O., Roh J.Y., Lee J.R. Treatment of patients with refractory atopic dermatitis sensitized to house dust mites by using sublingual allergen immunotherapy. *Ann. Dermatol.*, 2015, Vol. 27, no. 1, pp. 82-86.

28. Ciepiela O., Zawadzka-Krajewska A., Kotuła I., Demkow U. The influence of sublingual immunotherapy on several parameters of immunological response in children suffering from atopic asthma and allergic rhinitis depending on asthma features. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2014, Vol. 82, no. 6, pp. 503-510.
29. Colas C., Monzon S., Venturini M., Lezaun A. Double-blind, placebo-controlled study with a modified therapeutic vaccine of *Salsola kali* (Russian thistle) administered through use of a cluster schedule. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 4, pp. 810-816.
30. Corrigan C.J., Kettner J., Doemer C., Cromwell O., Narkus A. Efficacy and safety of preseasonal-specific immunotherapy with an aluminium-adsorbed six-grass pollen allergoid. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 6, pp. 801-807
31. Cox L., Cohn J.R. Duration of allergen immunotherapy in respiratory allergy: when is enough, enough? *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2007, Vol. 98, no. 5, pp. 416-426
32. Cox L., Jacobsen L. Comparison of allergen immunotherapy practice patterns in the United States and Europe. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2009, Vol. 103, pp. 451-459.
33. Cox L., Nelson H., Lockey R. Allergen immunotherapy: a practice parameter third update. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, pp. 1-55.
34. Cox L.S., Linnemann D.L., Nolte H., Weldon D., Finegold I., Nelson H.S. Sublingual immunotherapy: a comprehensive review. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 5, pp. 1021-1035.
35. Creticos P.S., Schroeder J.T., Hamilton R.G., Balcer-Whaley S.L., Khattignavong A.P., Lindblad R. Immunotherapy with a ragweed-toll-like receptor 9 agonist vaccine for allergic rhinitis. *N. Engl. J. Med.*, 2006, Vol. 355, no. 14, pp. 1445-1455.
36. Creticos P.S., Van-Metre T.E., Mardiney M.R., Rosenberg G.L., Norman P.S., Adkinson N.Jr. Dose response of IgE and IgG antibodies during ragweed immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1984, Vol. 73, no. 1, Pt 1, pp. 94-104
37. Criado Molina A., Guerra Pasadas F., Daza Munoz J.C. Immunotherapy with an oral *Alternaria* extract in childhood asthma. Clinical safety and efficacy and effects on *in vivo* and *in vitro* parameters. *Allergol. Immunopathol.*, 2002, Vol. 30, no. 6, pp. 319-330.
38. Dahl R., Kapp A., Colombo G., de Monchy J.G., Rak S., Emminger W. Efficacy and safety of sublingual immunotherapy with grass allergen tablets for seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 118, no. 2, pp. 434-440.
39. Des-Roches A., Paradis L., Knani J., Hejjaoui A., Dhivert H., Chanez P. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. V. Duration of efficacy of immunotherapy after its cessation. *Allergy*, 1996, Vol. 51, pp. 430-433.
40. Des-Roches A., Paradis L., Ménardo J.-L., Bouges S., Daurès J.-P., Bousquet J. Immunotherapy with a standardized *Dermatophagoides pteronyssinus* extract. VI. Specific immunotherapy prevents the onset of new sensitizations in children. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, Vol. 99, pp. 450-453.
41. Di Rienzo V., Marcucci F., Puccinelli P., Parmiani S., Frati F., Sensi L., et al. Long-lasting effect of sublingual immunotherapy in children with asthma due to house dust mite: a 10-year prospective study. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, Vol. 33, no. 2, pp. 206-210
42. Di Rienzo V., Pagani A., Parmiani S., Passalacqua G., Canonica G.W. Post-marketing surveillance study on the safety of sublingual immunotherapy in pediatric patients. *Allergy*, 1999, Vol. 54, no. 10, pp. 1110-1113.
43. Dreborg S., Frew A. Allergen standardization and skin tests. EAACI Position Paper. *Allergy*, 1993, Vol. 48, Suppl. 14
44. Dunsky E.H., Goldstein M.F., Dvorin D.J., Belecanech G.A. Anaphylaxis to sublingual immunotherapy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 10, p. 1235.
45. Durham S.R., Riis B. Grass allergen tablet immunotherapy relieves individual seasonal eye and nasal symptoms, including nasal blockage. *Allergy*, 2007, Vol. 62, no. 8, pp. 954-957
46. Durham S.R., Walker S.M., Varga E.M., Jacobson M.R., O'Brien F., Noble W. Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy. *N. Engl. J. Med.*, 1999, Vol. 341, no. 7, pp. 468-475.
47. Durham S.R., Yang W.H., Pedersen M.R., Johansen N., Rak S. Sublingual immunotherapy with once-daily grass allergen tablets: a randomized controlled trial in seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 4, pp. 802-809.
48. Durham S.R., Ying S., Varney V.A., Jacobson M.R., Sudderick R.M., Mackay I.S., Kay A.B., Hamid Q.A. Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4⁺ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, Vol. 97, pp. 1356-1365
49. Ebner C., Siemann U., Bohle B., Willheim M., Wiedermann U., Schenk S., Klotz F., Ebner H., Kraft D., Scheiner O. Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen. *Clin. Exp. Allergy*, 1997, Vol. 27, pp. 1007-1015.
50. Ferrer M., Burches E., Pelaez A., Munoz A., Hernandez D., Basomba A. Double-blind, placebo-controlled study of immunotherapy with *Parietaria judaica*: clinical efficacy and tolerance. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 15, no. 4, pp. 283-292.
51. Focke M., Marth K., Flicker S., Valenta R. Heterogeneity of commercial timothy grass pollen extracts. *Clin. Exp. Allergy*, 2008, Vol. 38, pp. 1400-1408

52. Focke M., Marth K., Valenta R. Molecular composition and biological activity of commercial birch pollen allergen extracts. *Eur. J. Clin. Invest.* 2009, Vol. 39, pp. 429-436
53. Francis J.N., James L.K., Paraskevopoulos G., Wong C., Calderon M.A., Durham S.R., Till S.J. Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, Vol. 121, pp. 1120-1125.
54. Frew A.J. Immunotherapy of allergic disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 111, no. 2 Suppl., pp. S712-719.
55. Frew A.J. Injection immunotherapy. British Society for Allergy and Clinical Immunology Working Party. *Bmj.*, 1993, Vol. 307, no. 6909, pp. 919-923.
56. Frew A.J., Powell R.J., Corrigan C.J., Durham S.R. Efficacy and safety of specific immunotherapy with SQ allergen extract in treatment-resistant seasonal allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 2, pp. 319-325
57. Global strategy for asthma management and prevention. WHO/NHLBI workshop report: National Institutes of Health, National Heart, Lung and Blood Institute, Publication Number 95-3659; 1995 January 1995
58. Grembale R.D., Camporota L., Naty S., Tranfa C.M., Djukanovic R., Marsico S.A. Effects of specific immunotherapy in allergic rhinitic individuals with bronchial hyperresponsiveness. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 200, Vol. 162, no. 6, pp. 2048-2052.
59. Hamid Q.A., Schotman E., Jacobson M.R., Walker S.M., Durham S.R. Increases in IL-12 messenger RNA + cells accompany inhibition of allergen-induced late skin responses after successful grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1997, Vol. 99, pp. 254-260.
60. Hirsch S.R., Kalbfleisch J.H., Golbert T.M., Josephson B.M., McConnell L.H., Scanlon R. Rinkel injection therapy: a multicenter controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1981, Vol. 68, no. 2, pp. 133-155
61. Incorvaia C., Masieri S., Berto P., Scurati S., Frati F. Specific immunotherapy by the sublingual route for respiratory allergy. *Allergy Asthma Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 6, no. 1, p. 29
62. International Consensus Report on Diagnosis and Management of Asthma. International Asthma Management Project. *Allergy*, 1992, Vol. 47, no. 13 Suppl., pp. 1-61.
63. James L.K., Durham S.R. Update on mechanisms of allergen injection immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy*, 2008, Vol. 38, pp. 1074-1088.
64. James L.K., Shamji M.H., Walker S.M., Wilson D.R., Wachholz P.A., Francis J.N., Jacobson M.R., Kimber I., Till S.J., Durham S.R. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2011, Vol. 127, pp. 509-516.
65. Jutel M., Akdis M., Blaser K., Akdis C.A. Mechanisms of allergen specific immunotherapy – T-cell tolerance and more. *Allergy*, 2006, Vol. 61, pp. 796-807.
66. Jutel M., Akdis M., Budak F., Aebischer-Casaulta C., Wrzyszczyk M., Blaser K., Akdis C.A. IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, pp. 1205-1214.
67. Jutel M., Jaeger L., Suck R., Meyer H., Fiebig H., Cromwell O. Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 116, no. 3, pp. 608-613.
68. Kepley C.L., Cambier J.C., Morel P.A., Lujan D., Ortega E., Wilson B.S., Oliver J.M. Negative regulation of FcepsilonRI signaling by FcgammaRII costimulation in human blood basophils. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, Vol. 106, pp. 337-348.
69. Khinchi M.S., Poulsen L.K., Carat F., Andre C., Hansen A.B., Malling H.J. Clinical efficacy of sublingual and subcutaneous birch pollen allergen-specific immunotherapy: a randomized, placebo-controlled, double-blind, double-dummy study. *Allergy*, 2004, Vol. 59, no. 1, pp. 45-53.
70. Kleine-Tebbe J., Ribel M., Herold D.A. Safety of a SQ-standardised grass allergen tablet for sublingual immunotherapy: a randomized, placebo-controlled trial. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 2, p. 181
71. Lockey R.F., Benedict L.M., Turkeltaub P.C., Bukantz S.C. Fatalities from immunotherapy (IT) and skin testing (ST). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1987, Vol. 79, no. 4, pp. 660-677
72. Lombardi C., Giargioni S., Melchiorre A., Tiri A., Falagiani P., Canonica G.W. Safety of sublingual immunotherapy with monomeric allergoid in adults: multicenter post-marketing surveillance study. *Allergy*, 2001, Vol. 56, pp. 989-992.
73. Mailling H.J., Weeke B. EAACI immunotherapy position papers. *Allergy*, 1993, Vol. 48, Suppl. 14, pp. 9-35.
74. Marogna M., Massolo A., Berra D. The type of sensitizing allergen can affect the evolution of respiratory allergy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, pp. 1209-1215
75. Marogna M., Spadolini I., Massolo A., Canonica G.W., Passalacqua G. Randomized controlled open study of sublingual immunotherapy for respiratory allergy in real-life: clinical efficacy and more. *Allergy*, 2004, Vol. 59, no. 11, pp. 1205-1210
76. McCormack P.L., Wagstaff A.J. Ultra-short-course seasonal allergy vaccine (Pollinex Quattro). *Drugs*, 2006, Vol. 66, no. 7, pp. 931-938.
77. Meglio P., Bartone E., Plantamura M. A protocol for oral desensitization in children with IgE-mediated cow's milk allergy. *Allergy*, 2004, Vol. 59, pp. 980-987.

78. Mirone C., Albert F., Tosi A., Mocchetti F., Mosca S., Giorgino M. Efficacy and safety of subcutaneous immunotherapy with a biologically standardized extract of *Ambrosia artemisiifolia* pollen: a double-blind, placebo-controlled study. *Clin. Exp. Allergy*, 2004, Vol. 34, no. 9, pp. 1408-1414.
79. Moingeon P., Batard T., Fadel R. et al. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 2, pp. 151-165
80. Moingeon P., Batard T., Fadel R., Frati F., Sieber J., Van Overtvelt L. Immune mechanisms of allergen-specific sublingual immunotherapy. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 2, pp. 151-165
81. Moller C., Dreborg S., Ferdousi H.A., Halken S., Host A., Jacobsen L. Pollen immunotherapy reduces the development of asthma in children with seasonal rhinoconjunctivitis (the PAT-study). *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 109, no. 2, pp. 251-256.
82. Mosbech H., Osterballe O. Does the effect of immunotherapy last after termination of treatment? Follow-up study in patients with grass pollen rhinitis. *Allergy*, 1988, Vol. 43, no. 7, pp. 523-529.
83. Mösges R., Ritter B., Kayoko G., Allekotte S. Carbamylated monomeric allergoids as a therapeutic option for sublingual immunotherapy of dust mite- and grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis: a systematic review of published trials with a meta-analysis of treatment using Lais[®] tablets. *Acta Dermatovenerol. Alp. Panonica Adriat.*, 2010, Vol. 19, no. 4, p. 35.
84. Mungan D., Misirligil Z., Gurbuz L. Comparison of the efficacy of subcutaneous and sublingual immunotherapy in mite-sensitive patients with rhinitis and asthma – a placebo controlled study. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 1999, Vol. 82, no. 5, pp. 485-490.
85. Nelson H.S. Advances in upper airway diseases and allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 111, no. 3 Suppl., pp. S793-798.
86. Nelson H.S. Specific immunotherapy with allergen mixes: what is the evidence? *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 9, pp. 549-553.
87. Nelson H.S., Ikle D., Buchmeier A. Studies of allergen extract stability: the effects of dilution and mixing. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, Vol. 98, no. 2, pp. 382-388.
88. Nicklas R., Bernstein I., Blessing-Moore J., Fireman S., Gutman A., Lee R. Practice parameters for allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, Vol. 6, pp. 1001-1011.
89. Nielsen L., Johnsen C., Mosbech H., Poulsen L., Malling H. Antihistamine premedication in specific cluster immunotherapy: a double-blind, placebo-controlled study. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1996, Vol. 97, pp. 1207-1213.
90. Niggemann B., Jacobsen L., Dreborg S., Ferdousi H.A., Halken S., Host A. Five-year follow-up on the PAT study: specific immunotherapy and long-term prevention of asthma in children. *Allergy*, 2006, Vol. 61, no. 7, pp. 855-859.
91. Noon L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet*. 1911, Vol. I, pp. 1572-1573.
92. Nordic Council on Medicines. Registration of allergenic preparations. Nordic Guidelines. 2nd ed. Uppsala: NLN Publications, 1989, no. 23, pp. 1-34.
93. Nouri-Aria K.T., Wachholz P.A., Francis J.N., Jacobson M.R., Walker S.M., Wilcock L.K., Staple S.Q., Aalberse R.C., Till S.J., Durham S.R. Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, pp. 3252-3259.
94. Novak N., Bieber T., Allam J.P. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 6, pp. 733-739
95. Novembre E., Galli E., Landi F., Caffarelli C., Pifferi M., De Marco E. Coseasonal sublingual immunotherapy reduces the development of asthma in children with allergic rhinoconjunctivitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2004, Vol. 114, no. 4, pp. 851-857.
96. Ozdemir C., Kucuksezer U.C., Akdis M., Akdis C.A. Specific immunotherapy and turning off the T cell: how does it work? *Ann Allergy Asthma Immunol.*, 2011, Vol. 107, pp. 381-392.
97. Passalacqua G., Durham S.R. Allergic rhinitis and its impact on asthma update: allergen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 119, pp. 881-891.
98. Patel P., Salapatek A.M. Pollinex Quattro: a novel and well-tolerated, ultra short-course allergy vaccine. *Expert Rev. Vaccines*, 2006, Vol. 5, no. 5, pp. 617-629.
99. Patriarca G., Nucera E., Roncallo C. Oral desensitizing treatment in food allergy: clinical and immunological results. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2003, Vol. 17, no. 3, pp. 459-465
100. Penagos M., Compalati E., Tarantini F., Baena-Cagnani R., Huerta J., Passalacqua G., Canonica G.W. Efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis in pediatric patients 3 to 18 years of age: a meta-analysis of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2006, Vol. 97, no. 2, pp. 141-148.
101. Penagos M., Passalacqua G., Compalati E., Baena-Cagnani C.E., Orozco S., Pedroza A., Canonica G.W. Metaanalysis of the efficacy of sublingual immunotherapy in the treatment of allergic asthma in pediatric patients, 3 to 18 years of age. *Chest.*, 2008, Vol. 133, no. 3, pp. 599-609.
102. Pham-Thi N., de Blic J., Scheinmann P. Sublingual immunotherapy in the treatment of children. *Allergy*, 2006, Vol. 61, Suppl. 81, pp. 7-10
103. Pham-Thi N., Scheinmann P., Fadel R., Combebias A., Andre C. Assessment of sublingual immunotherapy efficacy in children with house dust mite-induced allergic asthma optimally controlled by pharmacologic treatment and mite-avoidance measures. *Pediatr Allergy Immunol.*, 2007, Vol. 18, no. 1, pp. 47-57.

104. Polosa R., Li Gotti F., Mangano G., Mastruzzo C., Pistorio M.P., Crimi N. Monitoring of seasonal variability in bronchial hyper-responsiveness and sputum cell counts in non-asthmatic subjects with rhinitis and effect of specific immunotherapy. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, Vol. 33, no. 7, pp. 873-881.
105. Radulovic S., Wilson D., Calderon M., Durham S. Systematic reviews of sublingual immunotherapy (SLIT). *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 6, pp. 740-752.
106. Rak S., Lowhagen O., Venge P. The effect of immunotherapy on bronchial hyperresponsiveness and eosinophil cationic protein in pollen-allergic patients. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1988, Vol. 82, pp. 470-480.
107. Rak S., Yang W.H., Pedersen M.R., Durham S.R. Once-daily sublingual allergen-specific immunotherapy improves quality of life in patients with grass pollen-induced allergic rhinoconjunctivitis: a double-blind, randomised study. *Qual Life Res.*, 2007, Vol. 16, no. 2, pp. 191-201.
108. Roberts G., Hurley C., Turcanu V., Lack G. Grass pollen immunotherapy as an effective therapy for childhood seasonal allergic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 117, no. 2, pp. 263-268.
109. Robinson D.S., Larché M., Durham S. Tregs and allergic disease. *J. Clin. Invest.*, 2004, Vol. 114, pp. 1389-1397.
110. Roder E., Berger M.Y., Hop W.C., Bernsen R.M., de Groot H., Gerth van Wijk R. Sublingual immunotherapy with grass pollen is not effective in symptomatic youngsters in primary care. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2007, Vol. 119, no. 4, pp. 892-898
111. Ross R.N., Nelson H.S., Finegold I. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of allergic rhinitis: an analysis of randomized, prospective, single- or double-blind, placebo-controlled studies. *Clin. Ther.* 2000, Vol. 22, no. 3, pp. 342-350.
112. Santos A., Van Ree R. Profilins: mimickers of allergy or relevant allergens? *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2011, Vol. 155, pp. 191-204
113. Savolainen J., Jacobsen L., Valovirta E. Sublingual immunotherapy in children modulates allergen-induced in vitro expression of cytokine mRNA in PBMC. *Allergy*, 2006, Vol. 61, pp. 1184-1190.
114. Schadlich P.K., Brecht J.G. Economic evaluation of specific immunotherapy versus symptomatic treatment of allergic rhinitis in Germany. *Pharmacoeconomics*, 2000, Vol. 17, no. 1, pp. 37-52.
115. Shamji M.H., Durham S.R. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin. Exp. Allergy*, 2011, Vol. 41, pp. 1235-1246.
116. Shanahan F. Nutrient Tasting and Signaling Mechanisms in the Gut. Mechanisms of immunologic sensation of intestinal contents. *F. Am. J. Physiol.*, 2000, Vol. 278, pp. 191-196.
117. Staden U., Rolinck-Werninghaus C., Brewe F. Specific oral tolerance induction in food allergy in children: efficacy and clinical patterns of reaction. *Allergy*, 2007, Vol. 62, no. 11, pp. 1261-1269.
118. Suko M., Mori A., Ito K., Okudaira H. Oral immunotherapy may induce T-cell anergy. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 1995, Vol. 107, suppl. 1-3, pp. 278-281
119. Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M. Immunologic self tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T-cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int. Immunol.*, 1998, Vol. 10, pp. 1969-1980
120. Taylor A., Verhagen J., Akdis C.A., Akdis M. T regulatory cells in allergy and health: a question of allergen specificity and balance. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2004, Vol. 135, no. 1, pp. 73-82
121. TePas E.C., Hoyte E.G., McIntire J.J., Umetsu D.T. Clinical efficacy of microencapsulated timothy grass pollen extract in grass-allergic individuals. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2004, Vol. 92, no. 1, pp. 1-2.
122. The current status of allergen immunotherapy (hyposensitisation). Report of a WHO/IUIS working group. *Allergy*, 1989, Vol. 44, no. 6, pp. 369-379.
123. Turkeltaub P.C., Rastogi S.C., Baer H., Anderson M.C., Norman P.S. A standardized quantitative skin-test assay of allergen potency and stability: studies on the allergen dose-response curve and effect of wheal, erythema, and patient selection on assay results. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1982, Vol. 70, no. 5, pp. 343-352.
124. Valenta R., Twaroch T., Swoboda I. Component-resolved diagnosis to optimize allergen-specific immunotherapy in the Mediterranean area. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 2007, Vol. 17, Suppl. 1, pp. 36-40.
125. Van-Metre T.E., Adkinson N.Jr., Amodio F.J., Lichtenstein L.M., Mardiney M.R., Norman P.S. A comparative study of the effectiveness of the Rinkel method and the current standard method of immunotherapy for ragweed pollen hay fever. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1980, Vol. 66, no. 6, pp. 500-513.
126. Vidal C., Enrique E., Gonzalo A., Moreno C., Tabar A.I.; Expert Clinical Participants. Diagnosis and allergen immunotherapy treatment of polysensitized patients with respiratory allergy in Spain: an Allergists' Consensus. *Clin. Transl. Allergy*, 2014, no. 4, p. 36.
127. Wachholz P.A., Nouri-Aria K.T., Wilson D.R., Walker S.M., Verhoef A., Till S.J., Durham S.R. Grass pollen immunotherapy for hayfever is associated with increases in local nasal but not peripheral Th1: Th2 cytokine ratios. *Immunology*, 2002, Vol. 105, pp. 56-62.
128. Wachholz P.A., Soni N.K., Till S.J., Durham S.R. Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2003, Vol. 112, pp. 915-922.
129. Walker S.M., Pajno G.B., Lima M.T., Wilson D.R., Durham S.R. Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 107, no. 1, pp. 87-93.

130. Walker S.M., Varney V.A., Gaga M., Jacobson M.R., Durham S.R. Grass pollen immunotherapy: efficacy and safety during a 4-year follow-up study. *Allergy*, 1995, Vol. 50, pp. 405-413.
131. Weber R.W. Cross-reactivity of pollen allergens: impact on allergen immunotherapy. *Ann. Allergy Asthma Immunol.*, 2007, Vol. 99, pp. 203-211.
132. Wilson D.R., Lima M.T., Durham S.R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 2005, Vol. 60, pp. 412.
133. Wilson D.R., Lima M.T., Durham S.R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis: systematic review and meta-analysis. *Allergy*, 2005, Vol. 60, no. 1, pp. 4-12.
134. Wilson D.R., Nouri-Aria K.T., Walker S.M., Pajno G.B., O'Brien F., Jacobson M.R., Mackay I.S., Durham S.R. Grass pollen immunotherapy: symptomatic improvement correlates with reductions in eosinophils and IL-5 mRNA expression in the nasal mucosa during the pollen season. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2001, Vol. 107, pp. 971-976.
135. Wilson D.R., Radulovic, Calderon M.A., Durham S.R. Sublingual immunotherapy for allergic rhinitis. *Allergy*, 2005.
136. Winther L., Malling H.J., Mosbech H. Allergen-specific immunotherapy in birch- and grass-pollen-allergic rhinitis. II. Side-effects. *Allergy*, 2000, Vol. 55, no. 9, pp. 827-835.
137. Winther L., Malling H.J., Moseholm L., Mosbech H. Allergen-specific immunotherapy in birch- and grass-pollen-allergic rhinitis. I. Efficacy estimated by a model reducing the bias of annual differences in pollen counts. *Allergy*, 2000, Vol. 55, no. 9, pp. 818-826.
138. Wurtzen P.A., Lund G., Lund K., Arvidsson M., Rak S., Ipsen H. A double-blind placebo-controlled birch allergy vaccination study II: correlation between inhibition of IgE binding, histamine release and facilitated allergen presentation. *Clin. Exp. Allergy*, 2008, Vol. 38, no. 8, pp. 1290-1301.

Авторы:

Федоров А.С. — врач иммунолог-аллерголог, ГБУЗ «Городская больница № 3» г. Калининграда, аспирант Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., заведующая лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий Инновационного парка, профессор кафедры молекулярной физиологии и биофизики, Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград, Россия

Бут-Гусаим В.И. — к.м.н., врач-пульмонолог, доцент кафедры терапии медицинского института, Балтийский федеральный университет имени И. Канта, г. Калининград, Россия

Литвиненко С.Н. — врач-пульмонолог, Калининградская областная клиническая больница, г. Калининград, Россия

Authors:

Fedorov A.S., Physician (Allergology/ Immunology), Regional Hospital No; Research Fellow, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Innovation Park; Professor, Department of Molecular Physiology and Biophysics, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

But-Gusaim V.I., PhD (Medicine), Physician (Pulmonology), Associate Professor, Department of Therapy, Medical Institute, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinenko S.N., Physician (Pulmonology), Kaliningrad Regional Clinical Hospital, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 25.05.2015

Отправлена на доработку 29.06.2015

Принята к печати 14.07.2015

Received 25.05.2015

Revision received 29.06.2015

Accepted 14.07.2015

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ИММУНОМОДУЛИРУЮЩЕЙ ТЕРАПИИ У БОЛЬНЫХ РИНОСИНОСИТОМ

Стагниева И.В.¹, Симбирцев А.С.²

¹ ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

² ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Латентные формы риносинусита протекают без болевого симптома. В патогенезе латентного течения ведущую роль играет иммунная недостаточность. Универсальным медиатором болевого раздражения и воспалительного процесса является субстанция Р. Цель: определение эффективности иммуномодулирующей терапии у больных с латентным течением риносинусита по уровню субстанции Р.

Пролечено 148 больных риносинуситом с отсутствием болевого симптома. Всем больным выполнено клиничко-лабораторное обследование, иммунограмма, исследование цитокинов IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , IFN γ и субстанции Р в сыворотке крови. Для коррекции вторичного иммунодефицита в стандартную схему лечения риносинусита у части больных с первого дня включали иммуномодулирующий препарат. В лечение остальных пациентов иммуномодулятор включен не был. Эффективность лечения оценивали по клиническим признакам и лабораторным показателям на 7-й день лечения.

У всех больных с латентным течением и отсутствием болевого симптома при риносинусите до начала лечения определяли уровень субстанции Р. Показанием к назначению иммуномодулирующей терапии был низкий уровень субстанции Р (ниже 100 пг/мл) и иммунная недостаточность, что было подтверждено дисбалансом цитокинов. Выбор препарата был обусловлен иммунопатогенезом: при катаральном риносинусите и дефиците клеточного звена назначали Реаферон-ЕС-липид; при гнойном риносинусите – Ликопид. У больных, получавших иммуномодулирующий препарат, иммунные показатели улучшились, а уровень субстанции Р на 7-й день лечения достиг показателей здоровых лиц. В группе больных с низким уровнем субстанции Р и иммунной недостаточностью, которые не получали иммуномодулирующий препарат, показатели иммунитета изменились статистически не достоверно, а уровень субстанции Р не имел динамики.

У больных с латентным течением риносинусита и отсутствием болевого симптома низкий уровень субстанции Р ($SP \leq 100$ пг/мл) в сыворотке крови свидетельствует об иммунной недостаточности и может служить показанием к иммуномодулирующей терапии. Индивидуальный подбор патогенетически обоснованной схемы иммуномодулирующей терапии в лечении больных с латентным течением риносинусита при отсутствии болевого симптома позволяет эффективно купировать тяжелый воспалительный процесс, нормализовать иммунный ответ, предупреждать затяжное течение заболевания и развитие осложнений, сократить сроки лечения до 8-10 дней.

Ключевые слова: иммунный статус, иммунодефицит, цитокины, риносинусит, субстанция Р, лицевая боль

Адрес для переписки:

Стагниева Ирина Вениаминовна
ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
344022, Россия, г. Ростов-на-Дону,
пер. Нахичеванский, 29.
Тел.: 8 (903) 401-69-08.
E-mail: irinastagnieva@yandex.ru

Address for correspondence:

Stagnieva Irina V.
Rostov State Medical University
344022, Russian Federation, Rostov-on-Don,
Nakhichevansky Lane, 29.
Phone: 7 (903) 401-69-08.
E-mail: irinastagnieva@yandex.ru

Образец цитирования:

И.В. Стагниева, А.С. Симбирцев, «Эффективность иммуномодулирующей терапии у больных риносинуситом» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 423-430.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-423-430

© Стагниева И.В., Симбирцев А.С., 2015

For citation:

I.V. Stagnieva, A.S. Simbirtsev, "Immunotherapy efficiency in rhinosinusitis patients", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 423-430.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-423-430

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-423-430>

IMMUNOTHERAPY EFFICIENCY IN RHINOSINUSITIS PATIENTS

Stagnieva I.V.^a, Simbirtsev A.S.^b

^a Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

^b Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Latent rhinosinusitis proceeds without facial pain symptoms. Immune deficiency plays a leading role in pathogenesis of the disease latency. Substance P seems to be a universal mediator of painful irritation and inflammation. The objective of our study was to determine effectiveness of therapies in patients with latent rhinosinusitis, in terms of substance P levels.

We treated 148 patients with rhinosinusitis, being free of local pains. All the patients underwent clinical and laboratory examination, including immune profile assessment, measurements of serum cytokines IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , IFN γ , and substance P. To correct a secondary immunodeficiency, the standard treatment of rhinosinusitis in a subgroup of the patients was accomplished by immunomodulatory drugs from the first day of therapy. The latter drugs were avoided for the rest of study group. Efficacy of treatment was evaluated by clinical signs and laboratory parameters on day 7 of the medication.

Pre-treatment levels of substance P were determined in all the patients with latent clinical course and lack of pain symptoms. Low substance P levels (< 100 pg/ml) were considered as indications for immunomodulatory therapy, due to immune deficiency confirmed by the cytokine imbalance. Choice of a specific drug was dependent on immunopathogenesis, i.e., for catarrhal rhinosinusitis and deficiency of cellular immunity, we administered IFN-ES-lipint; in cases of purulent rhinosinusitis, Likopid was applied. The patients treated with immunomodulatory drugs showed improvement of immune indexes by the 7th day of treatment, along with return of substance P levels to control values typical to healthy persons. Among patients with low substance P levels and immune deficiency (without immunomodulatory treatment), the immune parameters and substance P levels did not exhibit any sufficient changes over time.

Low contents of substance P (SP \leq 100 pg/ml) in blood serum in pain-free patients with latent rhinosinusitis are indicative of immune deficiency and may serve as an indication for immune modulation therapy. Individual selection of the pathogenetically proven schedule therapy, when treating patients with latent (painless) rhinosinusitis may result into effective prevention of severe inflammation, normalization of immune response, prevention of a protracted disease course, and appropriate complications, as well as shortening of treatment terms to 8-10 days.

Keywords: immune profile, immunodeficiency, cytokines, rhinosinusitis, substance P, facial pain

Введение

Воспалительные заболевания носа и околоносовых пазух занимают первое место среди патологии верхних дыхательных путей [5]. Хронизация процесса способствует появлению латентно протекающих и стертых форм риносинуситов [7]. Латентные формы риносинусита проявляются отсутствием такого важного клинического симптома, как лицевая боль, что не всегда свидетельствует о легком течении заболевания [6, 8]. Одним из основных факторов патогенеза латентного течения риносинусита является иммунная недостаточность [1]. В свою очередь, болевой раздражение является частью единой эволюционно сложившейся защитной системы, в которой болевые стимулы могут модулировать иммунный ответ, а активация иммунокомпетентных клеток через систему медиаторов влияет на возбудимость болевых путей [18]. Активация рецепторов боли, передача и модуляция болевого сигнала обеспечивается медиаторами воспаления. Универсальным медиатором болевого раздражения и воспалительного процесса является субстанция P (SP) [17]. Помимо нервных клеток, источником субстанции P могут являться макрофаги,

эозинофилы, лимфоциты, дендритные клетки и моноциты [12, 16]. Активность воспалительной реакции коррелирует с уровнем субстанции P в сыворотке крови [15]. Снижение уровня субстанции P при воспалительном процессе свидетельствует об иммунодефиците и проявляется отсутствием болевого симптома [18].

Целью исследования стало определение эффективности назначения иммуномодулирующей терапии у больных с латентным течением риносинусита.

Материалы и методы

Было пролечено 148 больных риносинуситом с отсутствием болевого симптома, находившихся на лечении в базовых отделениях кафедры болезней уха, горла, носа Ростовского государственного медицинского университета. Возраст обследуемых составил от 16 до 78 лет. Среди них мужчин было 62 (41,9%), женщин – 86 (58,1%). Оценка болевого симптома выполнялась с помощью «Многомерного вербально-цветового болевого теста» (МвЦБТ) [2]. Всем больным было выполнено полное клинико-лабораторное обследование, включающее сбор жалоб и анам-

неза, эндоскопию ЛОР-органов, рентгеновское исследование, гемограмму, иммунограмму. Параметры общего анализа крови определяли с помощью гематологического анализатора Cobas Micros 70 (ABX). Иммунофенотипирование лимфоцитов осуществлялось методом непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител CD3, CD4, CD8, CD16 («Сорбент», Москва) согласно методике производителя. Состояние гуморального иммунитета оценивали по уровню сывороточных иммуноглобулинов основных классов (IgM, IgG, IgA), который определяли методом радиальной иммунодиффузии по G. Mancini et al. с использованием моноспецифических сывороток и стандартов ФГУП «НПО МИКРОГЕН». Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов в сыворотке крови определяли методом осаждения полиэтиленгликолем (ПЭГ-6000). Определение секреторного IgA в слизистой носа производилось тест-системой «IgA-секреторный – ИФА-БЕСТ ЗАО «Вектор-Бест-Юг». Фагоцитарный индекс и фагоцитарное число определяли во взвеси лейкоцитов со стандартными частицами латекса диаметром 1,35 мкм («Иммуноскрин», Москва). Уровень цитокинов (пг/мл) IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, TNF α , IFN γ определяли методом иммуноферментного анализа наборами реактивов ЗАО «Вектор-Бест-Юг» и ООО «Цитокин» (Санкт-Петербург). Всем больным проведено исследование уровня субстанции P (SP) в сыворотке крови. Уровень субстанции P (пг/мл) в сыворотке крови пациентов определяли методом иммуноферментного анализа наборами Peninsula Laboratories, LLC фирмы Vachem Group (USA), Cat. No. S-1153.

По характеру патологического процесса больные были разделены на 2 группы: 1-я – пациенты с катаральным риносинуситом (n = 63), 2-я – с гнойным риносинуситом (n = 85). Контрольную группу составили здоровые молодые люди в возрасте 20-32 лет, не страдающие хроническими заболеваниями.

Для коррекции вторичного иммунодефицита в стандартную схему лечения риносинусита у части больных 1-й группы (подгруппа 1а, n = 35) с первого дня включали иммуномодулирующий препарат Реаферон-ЕС-липид – интерферон-альфа рекомбинантный, заключенный в липосомы и лиофильно высушенный (производитель ЗАО «Вектор-Медика», Россия). Препарат вводили внутрь по 500 тыс. МЕ 2 раза/сут. в течение 10 дней. В лечение остальных пациентов 1-й группы (подгруппа 1б, n = 28) иммуномодулятор включен не был. Для восстановления дренажа и аэрации околоносовых пазух проводили местную противовоспалительную терапию, используя топический кортикостероид – Мометазона фуруат в виде 2-х ингаляций (по 50 мкг) в каждую половину носа два раза в день (общая суточная доза 400 мкг) в течение 7 дней. Использование топических глюко-

кортикостероидов в качестве местной противовоспалительной терапии рекомендовано всеми современными стандартами лечения синуситов (Приказом МЗ РФ № 1201н от 20.12.2012 «Об утверждении стандарта первичной медико-санитарной помощи при остром синусите», EPOS-2012, IDSA-2012, др.) [1]. Не создавая терапевтической концентрации в крови, топические стероиды не вызывают системного иммуносупрессорного эффекта, а имеют положительное влияние на мукозальный иммунитет, уменьшая анаэробный гликолиз при клеточном метаболизме, предупреждая деградацию иммуноглобулинов.

Для снятия отека в полости носа назначали деконгестант – Ксилометазолин в виде капель для носа 3 раза в день в течение 5 дней. Для эвакуации экссудата из полости носа использовали ирригационную терапию, которую проводили изотоническими солевыми растворами. Таким образом, схема лечения больных 1а подгруппы включала: Реаферон-ЕС-липид – внутрь, местно (в полость носа) – Мометазона фуруат, Ксилометазолин, назальные души; схема лечения больных 1б подгруппы включала: местно (в полость носа) – Мометазона фуруат, Ксилометазолин, назальные души.

Для коррекции вторичного иммунодефицита в стандартную схему лечения гнойного риносинусита у части больных 2-й группы (подгруппа 2а, n = 44) с первого дня в стандартную схему включили иммуномодулирующий препарат Ликопид (производитель ЗАО «Пептек», Россия). Ликопид – полусинтетический иммуномодулятор, содержит в своем составе полный синтетический аналог природного пептидогликана (глюкозаминилмурамилдипептида), являющегося минимальным биологически активным вторичным фрагментом структуры клеточной стенки бактерий. Ликопид назначали сублингвально по 2 мг 3 раза/сут. в течение 10 дней. В лечение остальных пациентов 2-й группы (подгруппа 2б, n = 41) иммуномодулятор включен не был. В качестве этиотропной терапии все больные 2-й группы получали системную антибактериальную терапию – Амоксициллин/Клавуланат перорально в дозе 2 г/сут. в течение 5 дней. Таким образом, схема лечения больных 2а подгруппы включала: Амоксициллин/Клавуланат – внутрь, Ликопид – сублингвально, местно (в полость носа) – Мометазона фуруат, Ксилометазолин, назальные души; схема лечения больных 2б подгруппы включала: Амоксициллин/Клавуланат – внутрь, местно (в полость носа) – Мометазона фуруат, Ксилометазолин, назальные души.

Эффективность лечения ежедневно оценивали по клиническим признакам: улучшению самочувствия больных, восстановлению носового дыхания, уменьшению экссудата в полости носа; проводили болевое тестирование. Лабораторные показатели определяли при поступлении больных и на 7-й день лечения.

Результаты

У всех больных с латентным течением и отсутствием болевого симптома при риносинусите до начала лечения определяли уровень субстанции Р. Дифференциальное разделительное значение показателя уровня субстанции Р, при котором отсутствие болевого симптома свидетельствует о медиаторных нарушениях, было определено с использованием ROC-анализа и составило 98,3 пг/мл или приближенное значение 100 пг/мл. При достижении этой величины чувствительность метода соответствовала 83,95%, а специфичность – 100%. Площадь под ROC-кривой (AUC) имела высокое значение $0,914 \pm 0,024$ (z statistic 17,2 при $p < 0,0001$) при выраженной доверительной вероятности.

Тяжесть течения воспалительного процесса в 1 группе больных с катаральным риносинуситом и уровнем субстанции Р менее 100 пг/мл была обусловлена клеточным иммунодефицитом. У больных были выявлены нарушения процессов дифференцировки лимфоцитов: уменьшение количества CD3-, CD4-, CD16-клеток и увеличение CD8 (табл. 1).

Нарушение дифференцировки Т-лимфоцитов было подтверждено дисбалансом цитокинов (табл. 2). Низкие концентрации $IFN\gamma$ и высокие концентрации IL-4 у этих больных свидетель-

ствуют о смещении направленности дифференцировки Th1/Th2 в сторону Th2-пути. Это подтверждается и высокой концентрацией IL-10.

Клинические признаки воспалительного процесса (отек и инфильтрация слизистой оболочки полости носа, восстановление носового дыхания, отсутствие экссудата в полости носа) в 1а подгруппе больных были купированы к 5-6 дню лечения. Клинические признаки риносинусита в 1б подгруппе сохранялись в среднем на 3-4 дня дольше. Тестирование с помощью МвцБТ подтвердило отсутствие болевого симптома у всех пациентов 1-й группы в течение всего курса лечения.

Лабораторные показатели повторно определяли на 7-й день лечения. Исследование показателей иммунного статуса выявило достоверные отличия в результатах 1а и 1б подгрупп (табл. 1). В 1а подгруппе отмечена положительная динамика в отношении количества CD3, CD4, CD16-клеток и уменьшение CD8. В 1б подгруппе эти показатели изменились незначительно. Цитокиновый профиль пациентов 1а и 1б подгрупп также имел статистически достоверные отличия. В подгруппе 1а резко возросли концентрации IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF, $IFN\gamma$; концентрация IL-4 и IL-10 снизилась (табл. 2). Изменение цитокинового профиля больных 1б подгруппы имело слабую положительную динамику по уровню

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С КАТАРАЛЬНЫМ РИНОСИНУСИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (1 ГРУППА), М \pm m

Показатель	До лечения	7-й день лечения		Достоверность различий между 1а и 1б подгруппами
	1 группа (n = 63)	1а подгруппа (n = 35)	1б подгруппа (n = 28)	
Лейк., 10 ⁹ /л	9,455 \pm 0,155	6,545 \pm 0,245	7,825 \pm 0,134	p < 0,001
Эозин., %	1,132 \pm 0,174	2,212 \pm 0,124	1,081 \pm 0,13	p < 0,05
П/яд. нейтр., %	4,022 \pm 0,190	4,328 \pm 0,127	4,455 \pm 0,185	p > 0,1
С/яд. нейтр., %	57,225 \pm 0,845	58,112 \pm 1,012	58,156 \pm 0,563	p > 0,1
Лимф., %	33,535 \pm 0,612	35,125 \pm 0,515	32,379 \pm 0,542	p > 0,1
Моноц., %	4,063 \pm 0,311	5,103 \pm 0,324	4,935 \pm 0,321	p < 0,1
СОЭ	9,228 \pm 0,045	7,224 \pm 0,055	7,168 \pm 0,068	p > 0,1
CD3, %	36,933 \pm 2,312	55,815 \pm 3,115	41,022 \pm 1,933	p < 0,0001
CD3, 10 ⁹ /л	0,455 \pm 0,015	0,635 \pm 0,014	0,478 \pm 0,045	p < 0,0001
CD4, %	21,932 \pm 1,654	40,262 \pm 1,864	29,646 \pm 1,124	p < 0,0001
CD4, 10 ⁹ /л	0,404 \pm 0,011	0,530 \pm 0,013	0,453 \pm 0,015	p < 0,05
CD8, %	26,736 \pm 0,555	17,465 \pm 0,602	24,848 \pm 0,415	p < 0,0001
CD8, 10 ⁹ /л	0,428 \pm 0,007	0,272 \pm 0,009	0,345 \pm 0,009	p < 0,001
CD16 (NK), %	6,061 \pm 1,117	13,775 \pm 2,018	9,663 \pm 2,014	p < 0,05
CD20, %	14,926 \pm 0,711	15,474 \pm 0,622	16,787 \pm 0,626	p > 0,1
ФЧ, ед.	5,883 \pm 0,247	4,932 \pm 0,247	6,362 \pm 0,315	p < 0,05
ФП, %	56,667 \pm 1,025	62,255 \pm 1,064	65,045 \pm 0,988	p < 0,05
IgA, г/л	1,857 \pm 0,112	1,242 \pm 0,157	1,445 \pm 0,105	p < 0,01
IgG, г/л	10,853 \pm 0,342	12,507 \pm 0,412	12,772 \pm 0,317	p > 0,1
IgM, г/л	1,693 \pm 0,095	1,162 \pm 0,105	2,388 \pm 0,067	p < 0,0001
S IgA, мг/мл	0,152 \pm 0,017	0,163 \pm 0,015	0,143 \pm 0,011	p > 0,1
ЦИК, ед.	47,732 \pm 4,897	51,061 \pm 6,468	52,858 \pm 1,155	p > 0,1

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ С КАТАРАЛЬНЫМ РИНОСИНУСИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (1 ГРУППА), М±m

Цитокины	Контроль ная группа, пг/мл	До лечения	7-й день лечения		Достоверность различий между 1а и 1б подгруппами
		1 группа (n = 63) пг/мл	1а подгруппа (n = 35)	1б подгруппа, (n = 28)	
IL-1β	3,644±0,61	1,224±0,35	11,346±1,23	2,105±0,81	p < 0,0001
IL-4	1,749±0,23	12,950±0,91	6,445±0,26	11,142±0,42	p < 0,0001
IL-6	10,347±1,23	12,385±1,18	14,487±0,95	10,757±1,30	p < 0,001
IL-8	11,688±1,37	10,522±1,09	13,503±0,70	10,485±1,51	p < 0,05
IL-10	3,806±0,29	63,852±2,32	25,048±1,16	48,667±0,18	p < 0,0001
TNFα	0,176±0,04	0,320±0,05	1,901±0,16	0,181±0,02	p < 0,001
IFNγ	6,338±0,80	1,630±0,51	14,882±1,40	8,590±0,20	p < 0,0001

IL-10 и IFNγ и отсутствие динамики по остальным цитокинам.

Уровень субстанции Р на 7-й день лечения на фоне иммуномодулирующей терапии в 1а подгруппе стал увеличиваться и достиг показателей здоровых лиц. В подгруппе 1б динамика этого показателя практически отсутствует (рис. 1).

У больных 2 группы с гнойным риносинуситом до лечения показатели иммунитета выявили иммунодефицит по всем направлениям: страдает клеточное звено, гуморальное и фагоцитоз (табл. 3).

Цитокиновый баланс у пациентов 2 группы до лечения смещен в сторону противовоспалительных цитокинов, причем концентрации всех цитокинов резко снижены (табл. 4). У больных нарушены механизмы дифференцировки Т-лимфоцитов: снижена концентрация IL-4, IFNγ. В результате имеется тяжелое течение гнойного воспалительного процесса на фоне функциональной несостоятельности иммунной системы.

Клинические признаки воспалительного процесса в 2а подгруппе больных были купированы

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У БОЛЬНЫХ С ГНОЙНЫМ РИНОСИНУСИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (2 ГРУППА), М±m

Показатель	До лечения	7-й день лечения		Достоверность различий между 2а и 2б подгруппами
	2 группа (n = 85)	2а подгруппа (n = 44)	2б подгруппа (n = 41)	
Лейк., 10 ⁹ /л	11,045±0,201	8,512±0,324	9,702±0,125	p < 0,001
Эозин., %	1,163±0,121	1,210±0,135	0,965±0,155	p > 0,1
П/яд. нейтр., %	7,745±0,214	5,926±0,267	6,311±0,315	p < 0,01
С/яд. нейтр., %	56,956±0,584	64,423±0,615	57,635±0,518	p < 0,001
Лимф., %	25,763±0,404	32,417±0,521	26,885±0,367	p < 0,001
Моноц., %	4,145±0,288	5,672±0,241	5,165±0,233	p < 0,1
СОЭ	9,846±0,108	7,812±0,123	8,775±0,085	p < 0,001
CD3, %	50,489±0,698	62,452±0,815	56,356±0,743	p < 0,0001
CD3, 10 ⁹ /л	0,469±0,011	0,875±0,012	0,485±0,006	p < 0,0001
CD4, %	23,795±0,426	39,640±0,398	30,382±0,512	p < 0,0001
CD4, 10 ⁹ /л	0,452±0,008	0,544±0,012	0,565±0,012	p > 0,1
CD8, %	30,780±0,315	24,852±0,412	29,834±0,308	p < 0,0001
CD8, 10 ⁹ /л	0,461±0,010	0,402±0,012	0,441±0,013	p > 0,1
CD16 (NK), %	8,855±0,288	12,923±0,315	9,947±0,325	p < 0,0001
CD20, %	8,226±0,819	19,547±1,138	11,671±1,056	p < 0,0001
ФЧ, ед.	3,203±0,344	5,624±0,566	4,127±0,287	p < 0,01
ФП, %	46,942±1,341	60,611±2,147	47,989±1,865	p < 0,0001
IgA, г/л	0,925±0,055	1,734±0,039	1,492±0,040	p < 0,01
IgG, г/л	8,838±0,321	9,815±0,420	8,827±0,422	p < 0,05
IgM, г/л	1,535±0,064	2,103±0,095	2,283±0,058	p > 0,1
S IgA, мг/мл	0,107±0,005	0,187±0,006	0,104±0,008	p < 0,01
ЦИК, ед.	33,723±2,987	66,574±5,226	35,878±0,988	p < 0,0001

ТАБЛИЦА 4. ДИНАМИКА ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ У БОЛЬНЫХ С ГНОЙНЫМ РИНОСИНОСИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ (2 ГРУППА), М±m

Цитокины	Контрольная группа, пг/мл (n = 32)	До лечения	7 день лечения		Достоверность различий между 1а и 1б подгруппами
		2 группа (n = 85)	2а подгруппа (n = 44)	2б подгруппа (n = 41)	
IL-1β	3,644±0,61	2,013±0,52	8,572±1,74	5,392±0,810	p < 0,0001
IL-4	1,749±0,23	1,125±0,26	4,763±0,43	2,862±0,348	p < 0,0001
IL-6	10,347±1,23	5,984±0,91	17,174±2,01	6,974±1,254	p < 0,0001
IL-8	11,688±1,37	10,065±1,43	11,376±1,30	11,113±1,513	p > 0,1
IL-10	3,806±0,29	6,919±0,57	3,264±0,32	5,845±2,577	p < 0,001
TNFα	0,176±0,04	0,308±0,04	0,912±0,05	0,189±0,062	p < 0,001
IFNγ	6,338±0,80	4,367±0,71	18,451±1,11	7,088±1,015	p < 0,0001

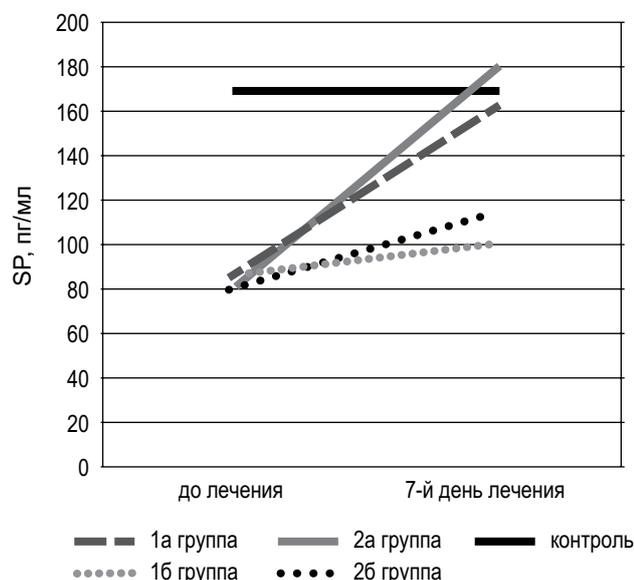


Рисунок 1. Динамика изменений уровня субстанции P (пг/мл) в сыворотке крови больных до и после лечения

на 8-10-й день лечения. В 2б подгруппе клинические признаки риносинусита сохранялись в среднем на 3-4 дня дольше. Тестирование с помощью МвцБТ подтвердило отсутствие болевого симптома у всех пациентов 2-й группы в течение всего курса лечения.

Лабораторные показатели повторно определяли на 7-й день лечения. Исследование показателей иммунного статуса выявило достоверные отличия в результатах 2а и 2б подгрупп (табл. 3). Во 2а подгруппе отмечено увеличение абсолютного и относительного числа лимфоцитов, увеличение функциональной активности фагоцитов, усилена дифференцировка CD4-, CD20- и CD16-клеток, повышен синтез специфических антител. В 2б подгруппе эти показатели достоверно меньше. Цитокиновый баланс в 2а подгруппе во время лечения изменился в сторону провоспалительных цитокинов: увеличилась концентрация IL-1β, IL-6, IL-8, TNFα; при этом концентрация

противовоспалительных цитокинов IL-4 и IL-10 не имела тенденции к снижению (табл. 4). Изменение цитокинового профиля больных 2б подгруппы имело слабую положительную динамику по уровню IL-4 и IFNγ и отсутствие динамики по остальным цитокинам.

Уровень субстанции P на 7-й день лечения на фоне иммуномодулирующей терапии в 2а подгруппе увеличился до контрольных значений. В подгруппе 2б динамики этого показателя нет (рис. 1).

Обсуждение

До лечения у больных 1 группы были выявлены нарушения процессов дифференцировки лимфоцитов: уменьшение количества CD3-, CD4-, CD16-клеток и увеличение CD8. Низкие концентрации IFNγ (1,63 пг/мл) и высокие концентрации IL-4 (12,95 пг/мл) у этих больных свидетельствовали о смещении направленности дифференцировки Th1/Th2 в сторону Th2 [10]. Это подтверждается и высокой концентрацией IL-10 (63,852±2,327 пг/мл). Таким образом, у пациентов с низким уровнем субстанции P (менее 100 пг/мл) и катаральным воспалением слизистой оболочки околоносовых пазух имеется клеточный иммунодефицит, подтвержденный дисбалансом цитокинов. При проведении иммуномодулирующего лечения у части больных этой группы (подгруппа 1а) резко возросла концентрация провоспалительных цитокинов IL-1β – в 9,29 раз, IL-6 – на 14,5%, IL-8 – на 22%, TNFα – в 5,9 раз; концентрация противовоспалительных цитокинов снизилась: IL-4 – в 2 раза, IL-10 – в 2,5 раза. У больных 1б подгруппы, которые получали лечение по стандартной схеме без иммуномодулятора, такой положительной динамики отмечено не было, а сроки клинического выздоровления были увеличены на 2-3 дня. Применение препарата Реоферон-ЕС-липид привело к нормализации направленности дифференцировки Th1/Th2 в сторону Th1, что проявилось в показателях

иммунограммы этих пациентов на 7-й день лечения (табл. 1). У больных отмечалось увеличение процента CD8- и CD16-клеток и абсолютного числа CD3, CD4. В результате проведенного лечения симптомы воспалительного процесса купировались на 4-5-й день заболевания, больные были выписаны по срокам, сравнимым с группой больных, не страдающих иммунодефицитом, на 8-й день лечения.

В 2а группе больных с гнойным риносинуситом и выраженным иммунодефицитом применение иммуномодулятора Ликопид позволило получить схожие результаты. При исследовании иммунного статуса до лечения мы увидели иммунодефицит по смешенному типу: снижение количества Т- и В-лимфоцитов, дисиммуноглобулинемия, снижение показателей фагоцитоза. Показатели иммунитета выявили иммунодефицит по всем направлениям: страдает клеточное звено, гуморальное и фагоцитоз (табл. 3). У этих больных цитокиновый баланс был смещен в сторону противовоспалительных цитокинов, причем концентрация всех цитокинов была ниже, чем в контрольной группе здоровых людей. Низкие концентрации IL-1 β нарушают процессы презентации антигена и не запускают иммунный ответ. Именно недостаточность продукции IL-1 β является причиной нарушения развития адекватного иммунного ответа [10]. У наших больных дисбаланс цитокинов соответствует данным литературы о балансе цитокинов при затяжном течении гнойных риносинуситов: имеется недостаточность продукции IL-1 β , невысокая продукция хемотаксического фактора – IL-8, снижение функциональной активности фагоцитов и угнетение процессов Т-клеточного иммунного ответа [3, 14]. Низкие концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β и IFN γ не индуцируют синтез субстанции Р, а высокие концентрации IL-10 блокируют рецепторы субстанции Р – болевого симптома нет. Эти нарушения взаимно усугубляют течение воспалительного процесса. Иммуномодулирующий препарат позволил увеличить функциональную активность фагоцитов, усилить пролиферацию Т- и В- лимфоцитов, повысить синтез специфических антител. Цитокиновый баланс во время лечения изменился в сторону провоспалительных цитокинов: увеличилась концентрация IL-1 β – в 4,26 раз, IL-6 – на 2,87 раз, IL-8 – на 11%, TNF α – в 3 раза; при этом концентрация противовоспалительных цитокинов не имела тенденции к снижению IL-4 – увеличился в 4,25 раза, IL-10 – снизился незначительно на 25%. Применение иммуномодулирующего препарата Ликопид у этой

группы больных позволило нормализовать Th2-опосредованный иммунный ответ, за счет стимуляции выработки IL-4 [9]. Улучшить клеточное звено, гуморальное и фагоцитоз, что проявилось в показателях иммунограммы этих пациентов на 7-й день лечения (табл. 3). У больных отмечалось увеличение процента CD8- и CD4-клеток и абсолютного числа В-лимфоцитов, фагоцитарного числа и показателя фагоцитоза, а также иммуноглобулинов G. Обычно сроки лечения больных риносинуситом с иммунными нарушениями составляют 12-14 дней [11].

Симптомы заболевания на фоне лечения купировались на 6-8-й день заболевания, больные были выписаны по срокам, сравнимым с группой больных с гнойным риносинуситом, не страдающих иммунодефицитом, на 10-й день лечения. У больных 2б подгруппы, которые получали лечение по стандартной схеме без иммуномодулятора, сроки клинического выздоровления были увеличены до 14 дней.

Назначение иммуномодулирующей терапии привело к повышению уровня субстанции Р в сыворотке крови пациентов 1а и 2а подгрупп до показателя контрольной группы. Уровень субстанции Р у пациентов 1б и 2б подгрупп, получавших лечение по стандартной схеме без иммуномодуляторов практически не изменился, а цитокиновый профиль этих больных выявил после лечения низкие концентрации провоспалительных цитокинов IL-1 β и IFN γ , которые не индуцируют синтез субстанции Р, и высокие концентрации IL-10, которые блокируют рецепторы субстанции Р, боли нет. Это позволяет предположить, что отсутствие болевого симптома и низкие значения субстанции Р были следствием иммунной недостаточности и могут являться маркером иммунодефицита.

Выводы

1. У больных с латентным течением риносинусита и отсутствием болевого симптома низкий уровень субстанции Р ($SP \leq 100$ пг/мл) в сыворотке крови свидетельствует об иммунной недостаточности и может служить показанием к иммуномодулирующей терапии.

2. Индивидуальный подбор патогенетически обоснованной схемы иммуномодулирующей терапии в лечении больных с латентным течением риносинусита при отсутствии болевого симптома позволяет эффективно купировать тяжелый воспалительный процесс, нормализовать иммунный ответ, предупреждать затяжное течение заболевания и развитие осложнений, сократить сроки лечения до 8-10 дней.

Список литературы / References

1. Абдулкеримов Х.Т., Гарашенко Т.И., Кошель В.И., Свистушкин В.М., под ред. Рязанцева С.В. Принципы этиопатогенетической терапии острых синуситов: методические рекомендации. СПб.: Полиформ Групп, 2014. 40 с. [Abdulkerimov Kh.T., Garashchenko T.I., Koshelev V.I., Svistushkin V.M., Ryazantsev S.V., red. Principles etiopathogenic therapy of acute sinusitis: guidelines]. St. Petersburg: Poliform Grupp, 2014. 40 p.
2. Адашинская Г.А., Мейзеров Е.Е. Многомерный вербально-цветовой тест // Боль, 2005. №1 (6). С. 26-33. [Adashinskaya G.A., Meyzerov E.E. Multivariate verbal-color test. *Bol' = Pain*, 2005, no. 1 (6), pp. 26-33. (In Russ.)]
3. Азнабаева Л.Ф., Шарипова Э.Р., Арефьева Н.А., Симбирцев А.С., Викторова Т.В., Зайнуллина А.Г. Патогенетические особенности течения гнойного воспаления верхних дыхательных путей (риносинусита) в зависимости от генетического контроля продукции интерлейкина 1β // Цитокины и воспаление, 2011. № 2. С. 50-55. [Aznabaeva L.F., Sharipova E.R., Aref'eva N.A., Simbirtsev A.S., Viktorova T.V., Zaynullina A.G. Pathogenetic features of the upper respiratory tract purulent inflammation (rhinosinusitis), depending on the genetic control of interleukin 1β production. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation 2011*, Vol. 10, no. 2, pp. 50-55. (In Russ.)]
4. Андропова Т.М., Пинегин Б.В., Козлов И.Г. Ликопид (ГМПД) – современные представления. 5-е изд., доп. и перераб. Россия, 2009. 20 с. [Andronova T.M., Pinegin B.V., Kozlov I.G. Likopid (GMPD) – modern representations. 5th ed., ext. and rev.]. Russia, 2009. 20 p.
5. Бойко Н.В., Колесников В.Н., Левченко Е.В. Статистика причин затруднения носового дыхания // Российская ринология, 2007. № 2. С. 24-25. [Boyko N.V., Kolesnikov V.N., Levchenko E.V. Statistics reasons nasal breathing difficulties. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2007, no. 2, pp. 24-25. (In Russ.)]
6. Бойко Н.В., Стагниева И.В. Дифференциальная диагностика лицевых болей // Российская ринология, 2012. № 4. С. 39-41. [Boyko N.V., Stagnieva I.V. Differential diagnosis of facial pain. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology*, 2012, Vol. 20, no. 4, pp. 39-41. (In Russ.)]
7. Волков А.Г., Стагниева И.В. Острый и хронический фронтит: современный взгляд проблему // Вестник оториноларингологии, 2012. № 6. С. 98-102. [Volkov A.G., Stagnieva I.V. Acute and chronic sinusitis: the current view of the problem. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2012, no. 6, pp. 98-102. (In Russ.)]
8. Волков А.Г., Стагниева И.В., Ерошенко А.Ю. Значимость локального болевого симптома при фронтите // Вестник оториноларингологии, 2010. № 4. С.38-40. [Volkov A.G., Stagnieva I.V., Eroshenko A.Yu. Significance of local pain syndrome in patients with frontitis. *Vestnik otorinolaringologii = Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2010, no. 4, pp. 38-40. (In Russ.)]
9. Гурьянова С.В., Козлов И.Г., Мещерякова Е.А., Алексеева Л.Г., Андропова Т.М. Глюкозаминилмурамилдипептид нормализует баланс Th1/Th2 при atopической бронхиальной астме // Иммунология, 2009. Т. 30, № 5. С. 305-309. [Guryanova S.V., Kozlov I.G., Meshcheryakova E.A., Alekseeva L.G., Andronova T.M. Investigation into the influence of glucosaminylmuramyl dipeptide on the normalization of Th1/Th2 balance in patients with atopic bronchial asthma. *Immunologia = Immunology*, 2009, Vol. 30, no. 5, pp. 305-309. (In Russ.)]
10. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
11. Стагниева И.В., Гукасян Е.В. Оценка болевого симптома при заболеваниях носа и околоносовых пазух // Медицинский вестник Юга России, 2012. № 2. С. 70-73. [Stagnieva I.V., Gukasyan E.L. Facial pain in diseases of nose and paranasal sinuses. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Bulletin of the South of Russia*, 2012, no. 2, pp. 70-73. (In Russ.)]
12. Стагниева И.В., Бойко Н.В. Головная и лицевая боль при риносинусите // Медицинский вестник Юга России, 2014, № 3. С. 55-59. [Stagnieva I.V., Boyko N.V. Headache and facial pain in rhinosinusitis. *Meditsinskiy vestnik Yuga Rossii = Medical Bulletin of the South of Russia*, 2014, no. 3, pp. 55-59. (In Russ.)]
13. Усова С.В., Бажутин Н.Б., Войтенко А.В., Таргонский С.Н. Получение липосомального препарата рекомбинантного альфа-2в интерферона «РЕАФЕРОН-ЕС-ЛИПИИТ» и опыт применения его для экстренной профилактики гриппа и других острых респираторных вирусных инфекций // Поликлиника, 2009. № 1. С. 110-112. [Usova S.V., Bazhutin N.B., Voytenko A.V., Targonskiy S.N. Obtaining liposomal formulation of recombinant interferon alfa-2b «REAFERON-ES-LIPINT» and experience of its application for emergency prevention of influenza and other acute respiratory viral infections. *Poliklinika = Polyclinic*, 2009, no. 1, pp. 110-112. (In Russ.)]
14. Янов Ю.К. Современные возможности оптимизации медикаментозной терапии острых синуситов // Российская оториноларингология, 2004. № 4. С. 10-15. [Yanov Yu.K. Modern possibilities of optimizing drug therapy of acute sinusitis. *Rossiyskaya otorinolaringologiya = Russian Otorhinolaryngology*, 2004, no. 4, pp. 10-15. (In Russ.)]
15. Koon H.W., Pothoulakis C. Immunomodulatory properties of substance P: the gastrointestinal system as a model. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2006, Vol. 1088, pp. 23-40.
16. Marriott I., Bost K.L. Substance P receptor mediated macrophage responses. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2001, no. 493, pp. 247-254.
17. Omoigui S. The biochemical origin of pain – Proposing a new law of pain: The origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 2 of 3 – A unifying law of pain. *Medical Hypotheses*, 2007, Vol. 69, Is. 6, pp. 1169-1178.
18. Ren K., Dubner R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. *Nat. Med.*, 2010, Vol. 16, no. 11, pp. 1267-1276.

Авторы:

Стагниева И.В. – к.м.н., доцент кафедры болезней уха, горла носа ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Симбирцев А.С. – д.м.н., профессор, директор института, ФГУП «Государственный НИИ особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Stagnieva I.V., PhD (Medicine), Associate Professor, ORL Department, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Highly Pure Biopreparations, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 31.03.2015

Принята к печати 14.04.2015

Received 31.03.2015

Accepted 14.04.2015

ХАРАКТЕРИСТИКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СОСТАВА Т- И В-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМИ ОБСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ ЛЕГКИХ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ СИНЕГНОЙНОЙ ИНФЕКЦИИ

Борисов А.Г.¹, Савченко А.А.¹, Кудрявцев И.В.^{2,3}, Мошев А.В.¹, Козлов В.А.⁴

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких (ХОБЛ) под воздействием поливалентной вакцины для профилактики и терапии синегнойной инфекции для обоснования ее применения как иммуностимулятора микробного происхождения. Обследовано 60 больных (39 мужчин и 21 женщина в возрасте 40-58 лет) с верифицированным диагнозом ХОБЛ II-III степени. С помощью простой рандомизации обследуемые были разделены на две группы. Группа 1 – 30 больных ХОБЛ (20 мужчин и 10 женщин), получающие лечения по традиционной схеме. Группа 2 – 30 больных ХОБЛ (19 мужчин и 11 женщин), получающих лечение по традиционной схеме и дополнительно, с профилактической целью, получающих вакцину «Псевдовак». Вакцина «Псевдовак» вводилась согласно инструкции по применению лекарственного препарата. Иммунологические исследования были проведены трижды: при поступлении в стационар, на 10-й и на 20-й день госпитализации. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей (19 мужчин и 16 женщин) аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипического состава Т- и В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител. Обнаружено, что субпопуляционный состав Т- и В-лимфоцитов у больных ХОБЛ характеризуется снижением количества Т-лимфоцитов (за счет

Адрес для переписки:

Кудрявцев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-29-29
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Address for correspondence:

Kudryavtsev Igor' V.
Research Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-29-29
E-mail: igorek1981@yandex.ru

Образец цитирования:

А.Г. Борисов, А.А. Савченко, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев, В.А. Козлов, «Характеристика субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких при использовании вакцины для профилактики синегнойной инфекции» // *Медицинская иммунология*, 2015. Т. 17, № 5. С. 431-442. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-431-442

© Борисов А.Г. и соавт., 2015

For citation:

A.G. Borisov, A.A. Savchenko, I.V. Kudryavtsev, A.V. Moshev, V.A. Kozlov, "Characteristics of T- and B-cell subpopulation profile in the patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 431-442. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-431-442

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-431-442>

фракции цитотоксических Т-клеток) и повышением содержания В-лимфоцитов. В ответ на развитие бактериальной инфекции повышается относительное количество НКТ- и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов у больных ХОБЛ характеризуется повышением относительного количества Т-регуляторных клеток и Th₂-лимфоцитов, а также Т-клеток с экспрессией активационных маркеров. Субпопуляционный состав В-лимфоцитов у больных ХОБЛ определяется повышением уровней В2-, В1-клеток и В-клеток памяти при снижении уровня В-лимфоцитов с экспрессией CD23-рецептора. В процессе стандартного лечения данного инфекционно-воспалительного заболевания наблюдается тенденция к нормализации субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов. Однако количество Т-лимфоцитов к 20-му дню лечения остается сниженным (за счет фракции цитотоксических клеток), содержание В-лимфоцитов остается повышенным. Кроме того, при стандартном лечении ХОБЛ сохраняется высокий уровень НКТ- и Т-регуляторных клеток. Вакцина «Псевдовак» оказывает выраженное иммуноактивное действие на состояние адаптивного иммунитета, восстанавливая и/или нормализуя субпопуляционный состав Т- и В-лимфоцитов у больных ХОБЛ к 20-му дню лечения.

Ключевые слова: хроническая обструктивная болезнь легких, иммунная система, Т-лимфоциты, В-лимфоциты, Т-регуляторные клетки, вакцина «Псевдовак»

CHARACTERISTICS OF T- AND B-CELL SUBPOPULATION PROFILE IN THE PATIENTS WITH CHRONIC OBSTRUCTIVE PULMONARY DISEASE TREATED WITH VACCINE AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Borisov A.G.^a, Savchenko A.A.^a, Kudryavtsev I.V.^{b, c}, Moshev A.V.^{b, c}, Kozlov V.A.^d

^a Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

^c Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

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

Abstract. The aim of this study was to evaluate subpopulational profiles of T- and B-lymphocytes in the patients with chronic obstructive pulmonary disease (COPD) under the influence of a multivalent vaccine against *Pseudomonas* pathogens, in order to justify its usage as a potential immune stimulator of microbial origin. Sixty patients (39 males and 21 females aged 40 – 58 years old) with verified diagnosis of COPD II-III degree were included into the study group. All the patients received a standard COPD therapy. In accordance with planned treatment, this cohort was divided into two groups using a simple randomization. Group 1 included thirty COPD patients (20 men and 10 women) who received standard treatment. Group 2 consisted of thirty COPD patients (19 men and 11 women) who received treatment according to conventional schedule, but further, they were additionally treated with «Pseudovac» vaccine used as a infection-preventing measure. The «Pseudovac» vaccine was injected, according to appropriate instructions for the drug use. Immunological evaluation was performed three times: at admission, as well as 10 and 20 days of treatment. As a control group, 35 healthy individuals (19 men and 16 women) of a similar age range have been examined. Assessment of T- and B- cell-specific immune phenotypes was determined by means of flow cytometry using direct immunofluorescence of leukocytes whole peripheral blood using specific monoclonal antibodies. We have found that T- and B- lymphocyte profiles in the COPD patients are characterized by decreased numbers of T-cells (due to drop in cytotoxic T-cells), and increased B-lymphocyte contents. Relative amounts of NKT- and $\gamma\delta$ T-lymphocytes

showed an increase in cases of developing bacterial infection. The T-lymphocyte subpopulations in patients with COPD are characterized by increase in relative numbers of regulatory T-cells, Th₂-lymphocytes, and T-cells expressing activation markers. B-lymphocyte population in COPD patients was characterized by increased levels of B2-, B1- and memory B-cells, along with reduced levels of CD23-receptor-positive B-lymphocytes. During a standard treatment of infectious and inflammatory disease in COPD patients, there is a tendency to normalization of T- and B-lymphocytes subpopulations. However, T lymphocyte number by the 20th day of treatment proved to be reduced (due to decrease in cytotoxic cells), whereas B-lymphocyte content was increased. Furthermore, the levels of NKT- and T-regulatory cells remain high at the standard COPD treatment. The «Pseudovac» vaccine exerts a pronounced immunoactive effect upon adaptive immunity, by means of restoring and/or normalizing T- and B-lymphocyte subpopulations in COPD patients by the 20th day of vaccine treatment.

Keywords: chronic obstructive pulmonary disease, immune system, T-lymphocytes, B-lymphocytes, T-regulatory cell, «Pseudovac» vaccine

Введение

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является одной из основных причин инвалидности и смертности [7, 12, 32]. В развитии обструкции при данной патологии большое значение принадлежит хроническому воспалению респираторного тракта с частыми обострениями, которые обычно связаны с бактериальными и вирусными инфекциями [6, 19, 29, 36]. Тяжесть воспалительных процессов при ХОБЛ повышается, если в развитии заболевания принимает участие грамотрицательная флора и, прежде всего, *Pseudomonas aeruginosa* [4, 11, 33, 37]. Как правило, при ведении больных с тяжелыми обострениями ХОБЛ, приводящими к острой дыхательной недостаточности, грамотрицательная микрофлора нечувствительна к антимикробной терапии. Все это требует новых подходов к профилактике и лечению ХОБЛ, одним из направлений которых является иммуотропная терапия.

Включение иммуоактивных препаратов в комплексную терапию больных ХОБЛ позволяет значительно повысить эффективность проводимой терапии: сократить длительность лечения, удлинить ремиссию заболевания, предотвратить осложнения [1, 10, 15]. Основной группой иммуностимулирующих препаратов, активно применяющихся при лечении ХОБЛ, являются лекарственные средства бактериального происхождения [1, 14, 20]. Иммуоактивный эффект этих препаратов обусловлен воздействием на паттерн-распознающие рецепторы клеток иммунной системы [9, 24, 31]. Подобным механизмом обладают и вакцины [8, 15]. Целесообразность применения именно вакцин связана с тем, что, с одной стороны, формируется адаптивный

иммунитет, с другой стороны – за счет активации врожденного иммунитета происходит и активация иммунной системы в целом.

Учитывая большую значимость в формировании ХОБЛ инфекции, вызванной *Pseudomonas aeruginosa*, целью исследования явилось изучение субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов у больных ХОБЛ под воздействием поливалентной вакцины для профилактики и терапии синегнойной инфекции для обоснования ее применения как иммуностимулятора микробного происхождения.

Материалы и методы

В исследование включены 60 больных (39 мужчин и 21 женщина в возрасте 40-58 лет) с верифицированным диагнозом ХОБЛ II-III степени (по рекомендациям GOLD, 2003). Из исследования исключали больных с пневмонией и другими причинами острой дыхательной недостаточности, не связанными с бронхиальной инфекцией (дисфункция левого желудочка, тромбоэмболия легочной артерии, пневмоторакс и др.), пациентов с бронхиальной астмой, диффузными бронхоэктазами, пороками развития легких, диффузными паренхиматозными заболеваниями легких, внелегочными инфекциями, злокачественными опухолями, нарушением мозгового кровообращения. С помощью простой рандомизации все больные были разделены на две группы. Группа 1 – 30 больных ХОБЛ (20 мужчин и 10 женщин), получающих лечение по традиционной схеме. Группа 2 – 30 больных ХОБЛ (19 мужчин и 11 женщин), получающих лечение по традиционной схеме и дополнительно, с профилактической целью, получающих вакцину для профилактики синегнойной инфекции

(вакцина «Псевдовак»). Вакцина «Псевдовак» вводилась согласно инструкции по применению лекарственного препарата (ЛП 001290-281111) в 1-4-6-8-10-й день по 0,2-0,4-0,6-0,8-1,0 мл в/м. Иммунологические исследования были проведены трижды: при поступлении в стационар, на 10-й и на 20-й день госпитализации. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей (19 мужчин и 16 женщин) аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипического состава Т- и В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующих панелях: CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5/HLA-DR-PC7, CD62L-FITC/CD127-PE/CD3-ECD/CD25-PC5/CD4-PC7, CD16-FITC/CD56-PE/CD8-ECD/

CD3-PC5/CD11b-PC7 и CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [27]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA) [5, 26]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (Q_{25} и Q_{75}). Достоверность различий между показателями

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУННОЙ СИСТЕМЫ У БОЛЬНЫХ ХОБЛ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВАКЦИНОЙ «ПСЕВДОВАК» (Me, Q_{25} - Q_{75})

Показатели	Группа	Контроль	Исходные	10-й день	20-й день
Лимфоциты $10^9/л$, абс.	1	2,05 1,65-2,49	2,09 1,64-2,56	2,15 1,64-2,56	1,83 1,34-2,26
	2		2,10 1,63-2,61	1,91 1,44-2,36	2,07 1,56-2,48
CD3 ⁺ , %	1	68,9 60,2-72,4	61,2*** 54,3-64,1	61,7** 54,7-64,6	63,5* 56,5-66,3
	2		60,8*** 53,4-63,6	62,7* 55,4-65,4	68,6### ^{oo} 61,9-71,3
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	1	42,1 34,0-48,0	38,2 31,5-41,0	38,3 31,7-41,2	39,9 33,3-43,6
	2		39,1 32,2-42,5	39,8 32,9-42,5	41,1 34,4-44,3
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	1	27,1 21,0-33,0	23,2** 16,4-26,2	23,3** 16,2-26,7	24,2* 17,2-27,8
	2		21,2** 14,3-24,2	23,6** 16,2-26,0	27,5# 20,2-30,1
CD19 ⁺ , %	1	13,2 8,9-17,1	22,1*** 15,6-25,5	22,0** 14,9-24,6	19,9** 13,2-22,9
	2		21,8*** 14,1-24,6	21,3** 14,3-24,2	14,7° 8,3-18,2

Примечание. Группа 1 – без применения в лечении вакцины «Псевдовак»; группа 2 – с применением в лечении вакцины; статистически значимые различия с показателями контрольной группы: * – $p < 0,05$, ** – $p < 0,01$, *** – $p < 0,001$; статистически значимые различия с исходными показателями: # – $p < 0,05$, ## – $p < 0,01$, ### – $p < 0,001$; при сравнении групп 1 и 2: ° – $p < 0,05$, °° – $p < 0,01$, °°° – $p < 0,001$.

независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Достоверность различий в динамике лечения определяли по критерию Вилкоксона (Wilcoxon matched pairs test). Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При исследовании состояния клеточного звена иммунной системы в динамике лечения больных ХОБЛ обнаружено, что в 1-е сутки обследования снижено относительное содержание CD3⁺ лимфоцитов относительно контрольных значений (табл. 1). На 10-е сутки лечения сниженный уровень CD3⁺ клеток сохраняется независимо от типа лечения. Однако на 20-е сутки при стандартном типе лечения пониженный уровень CD3⁺ клеток сохраняется, тогда как у больных, получавших вакцину «Псевдовак», процентное

количество CD3⁺ лимфоцитов нормализуется. Аналогичным образом при ХОБЛ изменяется относительное количество CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов: в 1-е и на 10-е сутки лечения их содержание понижено, на 20-е сутки содержание сниженного уровня при стандартном типе лечения и нормализация – при лечении с вакциной «Псевдовак». Кроме того, у больных ХОБЛ в периферической крови на 1-е и 10-е сутки лечения повышено процентное содержание CD19⁺ лимфоцитов. На 20-е сутки обследования у больных со стандартным типом лечения высокий уровень CD19⁺ клеток сохраняется, тогда как при лечении с вакциной «Псевдовак» их количество снижается до уровня контрольного диапазона.

При исследовании состояния Т-клеточного иммунитета также обнаружено, что при стандартном типе лечения на 20-е сутки снижается абсолютное количество CD3⁺ клеток (табл. 2). Независимо от типа лечения у больных ХОБЛ в 1-е сутки наблюдается повышенное процентное со-

ТАБЛИЦА 2. СОСТОЯНИЕ Т-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ХОБЛ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВАКЦИНОЙ «ПСЕВДОВАК» (Me, Q₂₅–Q₇₅)

Показатели	Группа	Контроль	Исходные	10-й день	20-й день
CD3 ⁺ , 10 ⁹ /л	1	1,41 0,89-1,81	1,28 0,76-1,69	1,33 0,82-1,73	1,16* 0,65-1,57
	2		1,27 0,76-1,68	1,34 0,83-1,75	1,35 0,84-1,76
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	1	6,7 4,7-8,6	8,7* 6,2-11,1	8,4 6,5-10,4	7,1 5,2-9,1
	2		8,4* 6,9-11,8	9,6 7,7-11,6	6,6 4,7-8,6
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	1	15,1 13,8-18,6	20,6** 18,7-22,6	17,6 15,7-20,3	16,7 14,8-18,7
	2		20,9** 19,0-22,9	23,6* 21,7-25,6	15,9# 14,0-17,9
CD3 ⁺ CD16/56 ⁺ , %	1	3,6 1,7-5,6	8,3*** 6,3-10,2	5,9* 3,9-7,9	5,8*# 3,9-7,8
	2		8,2*** 6,2-10,2	7,2** 5,2-9,1	4,6### 2,7-6,6
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , %	1	1,8 0,01-3,7	4,9*** 3,0-6,9	4,0*** 2,0-5,9	3,6*** 1,7-5,6
	2		4,9*** 2,9-6,8	3,9*** 2,0-5,9	2,6*#° 0,7-4,9
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺ , %	1	0,6 0,1-1,1	0,8 0,2-1,2	0,7 0,2-1,1	0,7 0,2-1,1
	2		0,7 0,2-1,1	1,0 0,4-1,4	0,7 0,1-1,1

Примечание. См. примечание к таблице 1.

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХОБЛ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВАКЦИНОЙ «ПСЕВДОВАК» (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Показатели	Группа	Контроль	Исходные	10-й день	20-й день
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , 10 ⁹ /л	1	0,50 0,34-0,75	0,48 0,28-0,56	0,50 0,30-0,58	0,44 0,24-0,52
	2		0,46 0,25-0,54	0,45 0,26-0,53	0,56 0,35-0,64
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD11b ⁺ , %	1	86,5 79,4-97,8	79,0 76,6-81,7	81,2 79,8-84,4	83,7 81,5-86,4
	2		79,2 69,8-82,4	88,3 86,6-91,4	86,6 84,5-89,4
CD3 ⁺ CD8 ⁺ CD16 ⁺ %	1	2,6 1,4-5,0	8,7*** 8,1-9,0	5,2*** 4,6-5,6	4,0## 3,5-4,4
	2		9,1*** 8,6-9,5	12,7*** ^{oo} 12,1-13,0	5,6*### ^o 5,0-6,0

Примечание. См. примечание к таблице 1.

ТАБЛИЦА 4. СОСТОЯНИЕ Т-ХЕЛПЕРНОГО ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ХОБЛ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВАКЦИНОЙ «ПСЕВДОВАК» (Me, Q₂₅-Q₇₅)

Показатели	Группа	Контроль	Исходные	10-й день	20-й день
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , 10 ⁹ /л	1	0,86 0,65-0,93	0,80 0,59-0,88	0,82 0,61-0,97	0,72 0,52-0,85
	2		0,81 0,55-0,89	0,85 0,65-0,93	0,75 0,51-0,83
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD62L ⁺ , %	1	26,3 20,5-34,3	24,0 22,4-27,7	25,9 22,7-29,0	24,6 22,9-27,9
	2		25,4 23,1-28,4	24,5 21,8-27,5	26,6 24,6-29,6
CD4 ⁺ CD294 ⁺ , %	1	12,6 11,9-15,0	18,8*** 16,8-20,8	16,7** 13,7-18,6	14,3## 12,3-16,3
	2		19,0*** 15,4-20,4	19,2*** ^{oo} 17,2-21,2	13,1### 11,2-15,1
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} , %	1	4,7 3,7-6,6	11,0*** 8,0-13,0	9,4*** 7,5-11,4	7,5** 5,5-9,5
	2		11,5*** 9,5-13,4	6,9*## ^{oo} 4,9-8,9	5,6*## ^{oo} 2,6-7,5
CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD127 ^{low} CD62L ⁺ , %	1	3,3 2,7-4,5	8,9*** 6,9-10,9	7,7*** 5,7-9,7	6,3*** 4,6-8,5
	2		8,4*** 6,6-11,9	8,9*** 7,0-10,9	4,4*## ^{oo} 2,4-6,3

Примечание. См. примечание к таблице 1.

держание CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺HLA-DR⁺ лимфоцитов, количество которых затем нормализуется. В 1-е сутки у больных ХОБЛ значительно повышено процентное количество CD3⁺CD16/56⁺ клеток. Независимо от типа лечения к 20-м суткам обследования содержание данной фракции клеток снижается. Однако при стандартном типе

лечения в конце периода наблюдения количество CD3⁺CD16/56⁺ клеток остается повышенным, тогда как при лечении с вакциной «Псевдовак» выявляется снижение содержания клеток до уровня контрольного диапазона. Также при ХОБЛ в 1-е сутки обследования наблюдается повышение процентного уровня CD3⁺CD4⁺CD8⁻

ТАБЛИЦА 5. СОСТОЯНИЕ В-КЛЕТОЧНОГО ЗВЕНА ИММУНИТЕТА У БОЛЬНЫХ ХОБЛ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ВАКЦИНОЙ «ПСЕВДОВАК» (Ме, Q₂₅-Q₇₅)

Показатели	Группа	Контроль	Исходные	10-й день	20-й день
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	1	0,27 0,07-0,35	0,46** 0,26-0,54	0,47** 0,27-0,55	0,36 0,16-0,44
	2		0,48** 0,27-0,55	0,46** 0,25-0,57	0,33 0,12-0,41
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1	1,6 1,1-2,1	5,6*** 3,6-7,6	4,7** 2,7-6,6	4,5** 1,3-5,6
	2		5,6*** 2,7-6,8	5,6*** 3,6-7,5	2,5*##°° 0,6-4,5
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	1	10,5 8,3-12,7	15,0* 13,1-17,0	16,3** 14,4-18,3	14,8* 12,9-16,8
	2		16,4** 14,4-18,3	15,5* 13,6-17,5	12,0*##°° 10,1-14,0
CD19 ⁺ CD5 ⁻ CD27 ⁺ , %	1	2,4 1,8-3,3	5,6*** 3,6-7,5	4,8** 2,8-6,8	3,6* 1,6-5,5
	2		5,5*** 3,5-7,5	3,8* 1,8-5,8	3,1 1,2-5,1
CD19 ⁺ CD23 ⁺ , %	1	11,4 9,0-13,6	8,0** 6,1-10,0	8,3** 6,4-10,29	9,3* 7,3-11,3
	2		7,7** 5,8-9,7	10,6 8,6-12,5	12,8*##°° 10,8-14,8

Примечание. См. примечание к таблице 1.

клеток. Их количество к концу периода наблюдения снижается независимо от типа лечения, но оставаясь повышенным относительно контрольного диапазона. Однако при лечении с вакциной к 20-му дню наблюдения выявляется значительно меньше клеток данной фракции, чем при стандартном типе лечения.

Изучение содержания цитотоксических Т-лимфоцитов позволило обнаружить, что у больных ХОБЛ в 1-е сутки обследования повышено относительное количество CD3⁺CD8⁺CD16⁺ клеток (табл. 3). В динамике наблюдения количество данного типа клеток снижается. Однако если при стандартном лечении выявляется понижение содержания CD3⁺CD8⁺CD16⁺ лимфоцитов до уровня контрольного диапазона, то при лечении с вакциной «Псевдовак» количество клеток на 20-е сутки остается повышенным как относительно контрольного диапазона, так и значений, выявленных у больных со стандартным типом лечения.

При исследовании состояния Т-хелперного звена иммунитета обнаружено, что у больных ХОБЛ в 1-е сутки наблюдения повышено процентное содержание CD4⁺CD294⁺ клеток (табл. 4). К концу периода наблюдения, незави-

симо от типа лечения, относительное количество CD4⁺CD294⁺ лимфоцитов снижается до уровня контрольного диапазона. Процентное содержание CD3⁺CD4⁺CD25^{High}CD27^{Low} клеток у больных ХОБЛ в 1-е сутки наблюдения выше, чем у лиц контрольной группы. При стандартном типе лечения количество клеток данного фенотипа сохраняется на повышенном уровне. При лечении с вакциной «Псевдовак» к концу периода наблюдения выявляется нормализация относительного количества CD3⁺CD4⁺CD25^{High}CD27^{Low} лимфоцитов. Процентное содержание CD3⁺CD4⁺CD25^{High}CD27^{Low}CD62L⁺ лимфоцитов у больных повышено в 1-е сутки наблюдения. Повышенное количество клеток с данным фенотипом сохраняется на протяжении всего периода наблюдения при стандартном типе лечения, но снижается к 20-м суткам наблюдения при лечении с вакциной «Псевдовак».

Абсолютное количество CD19⁺ лимфоцитов у больных ХОБЛ повышено относительно контрольных значений в 1-е и на 10-е сутки наблюдения, к 20-м суткам – количество клеток нормализуется независимо от типа лечения (табл. 5). В 1-е и на 10-е сутки обследования в периферической крови больных повышено

процентное содержание CD19⁺CD5⁺ клеток. Однако если при стандартном типе лечения на 20-е сутки количество клеток данного фенотипа остается повышенным, практически не изменяясь относительно исходного уровня, то при лечении с вакциной «Псеадовак» остается увеличенным относительно контрольных значений, но снижается как относительно исходного уровня, так и значений, выявленных в этот период наблюдения при стандартном типе лечения. Относительное содержание CD19⁺CD5⁻ и CD19⁺CD5⁺CD27⁺ лимфоцитов при ХОБЛ в 1-е и на 10-е сутки также повышенное относительно контрольных значений. При стандартном типе лечения количество клеток с данными фенотипами сохраняется повышенным и на 20-е сутки наблюдения, при лечении с вакциной «Псевдовак» — снижается до уровня контрольного диапазона. Кроме того, в 1-е сутки наблюдения у больных ХОБЛ в крови повышено процентное содержание CD19⁺CD23⁺ лимфоцитов. При стандартном типе лечения количество клеток с данным фенотипом сохраняется в течение всего периода наблюдения, при лечении с вакциной «Псевдовак» — снижается до контрольного диапазона уже на 10-е сутки.

Обсуждение

Анализ субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов у больных ХОБЛ в динамике лечения в зависимости от применения вакцины «Псевдовак» позволяет отметить следующее. Исходное состояние Т- и В-клеточного иммунитета у больных ХОБЛ характеризуется снижением количества Т-лимфоцитов, прежде всего за счет фракции цитотоксических Т-клеток, и повышением содержания В-лимфоцитов. Однако на фоне снижения количества общих Т-лимфоцитов повышается относительное содержание Т-клеток, экспрессирующих маркеры активации (CD25 и HLA-DR), NKT-клеток (CD3⁺CD16/56⁺) и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов (CD3⁺CD4⁻CD8⁻).

Необходимо отметить, что повышение (пусть и относительное) количества Т-лимфоцитов с экспрессией CD25- (α -цепь рецептора IL-2) и HLA-DR-маркеров (белок, принадлежащий к молекулам гистосовместимости II класса) отражает активационные процессы со стороны Т-клеточного иммунитета при воспалительных процессах [2, 13, 22].

Популяции NKT-клеток и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов в последнее время вызывают большой интерес при различных иммуновоспалительных процес-

сах. NKT-лимфоциты относят к клеткам врожденного иммунитета, представляют собой минорную популяцию Т-клеток, которая благодаря своей аутореактивности и способности быстро продуцировать различные цитокины обеспечивает связь между врожденным и адаптивным звеньями иммунитета и играет важнейшую роль в регуляции иммунного ответа [3, 9, 18]. Доказано, что NKT-клетки, помимо цитотоксической функции, выполняют роль основного источника цитокинов (в первую очередь, IFN γ) на начальных этапах развития иммунного ответа [9, 16]. Известно, что $\gamma\delta$ Т-лимфоциты также определяются как клетки врожденного и адаптивного иммунитета, кроме цитотоксической и антиген-презентирующей функций, также могут проявлять регуляторную активность [9, 21, 35]. Основное место их локализации — барьерные ткани, в том числе и слизистая респираторного тракта [9]. Повышение количества NKT-клеток и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов также можно связать с активацией клеточного иммунитета при ХОБЛ.

Аналогичные NKT-клеткам и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитам изменения в 1-е сутки обследования у больных ХОБЛ выявляются и со стороны цитотоксических Т-лимфоцитов: на фоне снижения их количества выявляется более чем 3-кратное увеличение процентного уровня клеток с фенотипом CD3⁺CD8⁺CD16⁺. CD16-антиген представляет собой низкоаффинный IgG-рецептор III типа [17]. Через данный тип рецептора реализуются механизмы антителозависимой цитотоксичности.

Количество Т-хелперов у больных ХОБЛ в 1-е сутки обследования соответствует контрольному диапазону, однако при этом повышается процентное содержание Th2-клеток (CD4⁺CD294⁺) и Т-регуляторных клеток (CD3⁺CD4⁺CD25^{High}CD127^{Low}), в том числе экспрессирующих маркер CD62L. Th2-клетки представляют собой субпопуляцию Т-хелперов, стимулирующих развитие гуморального иммунного ответа [28]. Повышение их количества при ХОБЛ обусловлено бактериальной инфекцией. Т-регуляторные клетки представляют собой отдельную фракцию CD4⁺Т-лимфоцитов, конститутивно экспрессирующих рецептор CD25 [30, 34]. Основная функция Т-регуляторных клеток — супрессия любых форм иммунного ответа. CD62L является мембранным гликопротеином, принадлежащим к семейству L-селектинов, который экспрессируется на широком спектре клеток иммунной системы [23, 25]. Рецептор

обеспечивает слабые межклеточные взаимодействия, благодаря которым движение клеток вдоль сосудистой стенки замедляется и происходит их миграция из сосудистого русла. Экспрессия на Т-регуляторных клетках у больных ХОБЛ в 1-е сутки обследования характеризует вовлечение данной популяции лимфоцитов в иммуновоспалительный процесс.

Этиологическим фактором ХОБЛ является бактериальная инфекция, в связи с этим, соответственно, у обследованных пациентов уже на 1-е сутки лечения выявляется увеличение количества общих В-лимфоцитов, которое связано с повышением содержания В2- (основная фракция В-лимфоцитов) и В1-клеток (минорная фракция). При этом также повышается уровень В-клеток памяти ($CD19^+CD5^+CD27^+$) и снижается количество В-лимфоцитов, экспрессирующих низкоаффинный рецептор IgE (CD23).

В процессе лечения состояние иммунной системы у больных ХОБЛ меняется. Однако, сравнивая динамику изменения исследуемых иммунологических показателей у больных при стандартном лечении и с вакциной «Псевдовак», обнаружено, что при введении вакцины изменение значений иммунологических показателей более выражено. Так, к 20-му дню стандартного лечения у больных ХОБЛ остается пониженным содержание общих и цитотоксических Т-лимфоцитов, при высоком содержании В-клеток, тогда как при использовании вакцины «Псевдовак» наблюдается нормализация значений данных показателей. В то же время при лечении вакциной выявляется сохранение на повышенном уровне количества Т-лимфоцитов с экспрессией низкоаффинного IgG-рецептора, тогда как при стандартном лечении наблюдается нормализация их содержания.

Независимо от вида лечения у больных ХОБЛ к концу наблюдаемого периода до контрольного диапазона снижается количество Т-лимфоцитов с экспрессией CD25- и HLA-DR-маркеров. Также независимо от вида лечения к 20-му дню наблюдения снижается уровень НКТ-клеток. Однако если при стандартном лечении к концу наблюдаемого периода содержание НКТ-клеток остается повышенным, то при использовании вакцины «Псевдовак» происходит нормализация их содержания. В то же время содержание $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов остается повышенным.

Независимо от вида лечения к концу наблюдаемого периода наблюдается снижение количества Th2-клеток до уровня контрольного диапазона.

В то же время содержание Т-регуляторных клеток (в том числе с экспрессией CD62L-рецептора) при стандартном виде лечения остается повышенным, тогда как при лечении вакциной «Псевдовак» снижается до контрольного уровня.

Содержание В2-лимфоцитов в крови больных ХОБЛ снижается к 20-му дню наблюдения до контрольного уровня только при лечении вакциной «Псевдовак», тогда как количество В1-клеток в конце периода наблюдения остается повышенным независимо от вида лечения. Под действием вакцины также нормализуется содержание В-клеток памяти и В-лимфоцитов с экспрессией CD23-маркера.

Таким образом, состояние иммунной системы у больных ХОБЛ характеризуется как гипореактивное со снижением количества Т-лимфоцитов (за счет фракции цитотоксических Т-клеток) и повышением содержания В-лимфоцитов. В ответ на развитие бактериальной инфекции повышается относительное количество НКТ- и $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов. Субпопуляционный состав Т-лимфоцитов у больных ХОБЛ характеризуется повышением относительного количества Т-регуляторных клеток и Th2-лимфоцитов, а также Т-лимфоцитов с экспрессией активационных маркеров. Особенности субпопуляционного состава В-лимфоцитов определяются повышением уровней В2-, В1-клеток и В-клеток памяти при снижении уровня В-лимфоцитов с экспрессией CD23-рецептора. В процессе стандартного лечения данного инфекционно-воспалительного заболевания наблюдается тенденция к нормализации субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов. Однако количество Т-лимфоцитов к 20-му дню лечения остается сниженным (за счет фракции цитотоксических клеток), содержание В-лимфоцитов остается повышенным. Кроме того, при стандартном лечении ХОБЛ сохраняется высокий уровень НКТ- и Т-регуляторных клеток. Вакцина «Псевдовак» оказывает выраженное иммуноактивное действие на состояние адаптивного иммунитета, восстанавливая и/или нормализуя субпопуляционный состав Т- и В-лимфоцитов у больных ХОБЛ к 20-му дню лечения. В связи с тем, что вакцина против синегнойной палочки обладает выраженной положительной эффективностью на иммунную систему больных ХОБЛ, можно рекомендовать вакцину «Псевдовак» в комплексном лечении больных ХОБЛ.

Список литературы / References

1. Козлов В.А., Борисов А.Г., Смирнова С.В., Савченко А.А. Практические аспекты диагностики и лечения иммунных нарушений. Новосибирск: Наука, 2009. 274 с. [Kozlov V.A., Borisov A.G., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Practical aspects of diagnosis and treatment of immune disorders]. Novosibirsk: Nauka, 2009. 274 p.
2. Савченко А.А., Шимохина Н.Ю., Петрова М.М., Борисов А.Г., Пилюгина М.С., Мошев А.В. Фенотипический состав лимфоцитов крови у больных острым коронарным синдромом в сочетании с расстройствами тревожно-депрессивного спектра // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17) № 4. С. 1019-1027. [Savchenko A.A., Shimohina N.Ju., Petrova M.M., Borisov A.G., Pilyugina M.S., Moshev A.V. Phenotype of blood lymphocytes of patients with acute coronary syndromes in conjunction with anxiety-depressive disorder. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 1019-1027. (In Russ.)]
3. Савченко А.А., Модестов А.А., Мошев А.В., Тоначева О.Г., Борисов А.Г. Цитометрический анализ NK- и NKT-клеток у больных почечноклеточным раком // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 1012-1018. [Savchenko A.A., Modestov A.A., Moshev A.V., Tonacheva O.G., Borisov A.G. Flow cytometry of NK- and NKT-cells in patients with renal cell carcinoma. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 1012-1018. (In Russ.)]
4. Соловей Н.В. Клинические особенности и исходы терапии внутрибольничных инфекций, вызываемых синегнойной палочкой с различным уровнем устойчивости к антибиотикам // Клиническая инфектология и паразитология, 2013. № 4 (07). С. 26-39. [Solovey N.V. Clinical features and treatment outcomes of nosocomial infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* with different levels of resistance to antibiotics. *Klinicheskaya infektologiya i parazitologiya = Clinical Infectology and Parasitology*, 2013, no. 4 (07), pp. 26-39. (In Russ.)]
5. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
6. Цеймах И.Я., Момот А.П., Костюченко Г.И., Мамаев А.Н., Филонова Ю.А., Корнилова Т.А., Чучалин А.Г. Роль дисфункции эндотелия, сопряжения гемостатических и системных воспалительных реакций в патогенезе обострения хронической обструктивной болезни легких, зависимого от инфекционного воспаления // Терапевтический архив, 2013. Т. 85, № 3. С. 17-22. [Ceymah I.Ya., Momot A.P., Kostyuchenko G.I., Mamaev A.N., Filonova Yu.A., Kornilova T.A., Chuchalin A.G. The role of endothelial dysfunction, hemostatic interface and systemic inflammatory response in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease exacerbation dependent from infectious inflammation. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive*, 2013, Vol. 85, no. 3, pp. 17-22. (In Russ.)]
7. Чучалин А.Г., Белевский А.С., Овчаренко С.И., Королева И.А. Улучшение качества жизни и предотвращение обострений – реально достижимые цели терапии ХОБЛ (результаты национального исследования ИКАР-ХОБЛ) // Практическая пульмонология, 2006. № 2. С. 48-51. [Chuchalin A.G., Belevskij A.S., Ovcharenko S.I., Koroleva I.A. Improving of life quality and prevention of exacerbations – achievable goals of COLD treatment (results of a national study ICAR-COLD). *Prakticheskaya pul'monologiya = Practical Pulmonology*, 2006, no. 2, pp. 48-51. (In Russ.)]
8. Шубин И.В., Татевосов В.Р., Костинов М.П., Чучалин А.Г. Оценка эффективности вакцинотерапии в комплексном лечении нетяжелой внебольничной пневмонии у лиц молодого возраста в организованных коллективах // Практическая медицина, 2013. № 5 (74). С. 110-113. [Shubin I.V., Tatevosov V.R., Kostinov M.P., Chuchalin A.G. Evaluating the effectiveness of vaccine therapy in treatment of non-severe community-acquired pneumonia in young people in organized groups. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2013, no. 5 (74), pp. 110-113. (In Russ.)]
9. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
10. Alikhan M.M., Lee F.E. Understanding nontypeable *Haemophilus influenzae* and chronic obstructive pulmonary disease. *Curr. Opin. Pulm. Med.*, 2014, Vol. 20, no. 2, pp. 159-164.
11. Almagro P., Salvadó M., Garcia-Vidal C., Rodríguez-Carballeira M., Cuchi E., Torres J., Heredia J.L. *Pseudomonas aeruginosa* and mortality after hospital admission for chronic obstructive pulmonary disease. *Respiration*, 2012, Vol. 84, no. 1, pp. 36-43.

12. Baccioglu A., Gulbay B.E., Acican T. Body composition in patients with stable chronic obstructive pulmonary disease: comparison with malnutrition in healthy smokers. *Eurasian J. Med.*, 2014, Vol. 46, no. 3, pp. 169-175.
13. Bhela S., Kempell C., Manohar M., Dominguez-Villar M., Griffin R., Bhatt P., Kivisakk-Webb P., Fuhlbrigge R., Kupper T., Weiner H., Baecher-Allan C. Nonapoptotic and Extracellular Activity of Granzyme B Mediates Resistance to Regulatory T Cell (Treg) Suppression by HLA-DR-CD25^{hi}CD127^{lo} Tregs in Multiple Sclerosis and in Response to IL-6. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 5, pp. 2180-2189.
14. Borge C.R., Mengshoel A.M., Omenaas E., Moum T., Ekman I., Lein M.P., Mack U., Wahl A.K. Effects of guided deep breathing on breathlessness and the breathing pattern in chronic obstructive pulmonary disease: A double-blind randomized control study. *Patient Educ. Couns.*, 2015, Vol. 98, no. 2, pp. 182-190.
15. Clancy R.L. Towards a vaccine for chronic obstructive pulmonary disease. *Intern. Med. J.*, 2012, Vol. 42, no. 6, pp. 607-613.
16. Ghazarian L., Simoni Y., Magalhaes I., Lehuen A. Invariant NKT cell development: focus on NOD mice. *Curr. Opin. Immunol.*, 2014, Vol. 27, pp. 83-88.
17. He X., Liang H., Hong K., Li H., Peng H., Zhao Y., Jia M., Ruan Y., Shao Y. The potential role of CD16⁺V γ 2V δ 2 T cell-mediated antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity in control of HIV type 1 disease. *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*, 2013, Vol. 29, no. 12, pp. 1562-1570.
18. Issazadeh-Navikas S. NKT cell self-reactivity: evolutionary master key of immune homeostasis? *J. Mol. Cell. Biol.*, 2012, Vol. 4, no. 2, pp. 70-78.
19. Kim M., Cha S.I., Choi K.J., Shin K.M., Lim J.K., Yoo S.S., Lee J., Lee S.Y., Kim C.H., Park J.Y., Yang D.H. Prognostic value of serum growth differentiation factor-15 in patients with chronic obstructive pulmonary disease exacerbation. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*, 2014, Vol. 77, no. 6, pp. 243-250.
20. Kroegel C., Bakakos P. The inflammatory effector cell pattern in asthma and chronic obstructive pulmonary disease – what is it good for? *Respiration*, 2012, Vol. 83, no. 1, pp. 17-19.
21. Lertworapreecha M., Patumraj S., Niruthisard S., Hansasuta P., Bhattarakosol P. Cytotoxic function of gamma delta (gamma/delta) T cells against pamidronate-treated cervical cancer cells. *Indian J. Exp. Biol.*, 2013, Vol. 51, no. 8, pp. 597-605.
22. Létourneau S., Krieg C., Pantaleo G., Boyman O. IL-2- and CD25-dependent immunoregulatory mechanisms in the homeostasis of T-cell subsets. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 123, no. 4, pp. 758-762.
23. Li X., Zheng Y. Treg identity protection by an epigenetic switch. *Cell Cycle*, 2014, Vol. 13, no. 20, pp. 3159-3160.
24. Lim Y.J., Koo J.E., Hong E.H., Park Z.Y., Lim K.M., Bae O.N., Lee J.Y. A Src-family-tyrosine kinase, Lyn, is required for efficient IFN- β expression in pattern recognition receptor, RIG-I, signal pathway by interacting with IPS-1. *Cytokine*, 2015, Vol. 72, no. 1, pp. 63-70.
25. Linterman M.A., Denton A.E. Treg cells and CTLA-4: the ball and chain of the germinal center response. *Immunity*, 2014, Vol. 41, no. 6, pp. 876-878.
26. Luijckx J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, Vol. 10, pp. 102-108.
27. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
28. Mayer A., Debusson D., Denanglaire S., Eddahri F., Fievez L., Hercor M., Triffaux E., Moser M., Bureau F., Leo O., Andris F. Antigen presenting cell-derived IL-6 restricts Th2-cell differentiation. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 11, pp. 3252-3262.
29. Miravittles M., Anzueto A. Antibiotics for acute and chronic respiratory infection in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2013, Vol. 188, no. 9, pp. 1052-1057.
30. Miyara M., Ito Y., Sakaguchi S. TREG-cell therapies for autoimmune rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2014, Vol. 10, no. 9, pp. 543-551.
31. Oosting M., Cheng S.C., Bolscher J.M., Vestering-Stenger R., Plantinga T.S., Verschueren I.C., Arts P., Garritsen A., van Eenennaam H., Sturm P., Kullberg B.J, Hoischen A., Adema G.J., van der Meer J.W., Netea M.G., Joosten L.A. Human TLR10 is an anti-inflammatory pattern-recognition receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, Vol. 111, no. 42, pp. E4478-E4484.
32. Rabe K.F., Hurd S., Anzueto A. Global strategy for the diagnosis, management, and prevention of chronic obstructive pulmonary disease: GOLD executive summary. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2007, Vol. 176, pp. 532-555.
33. Rakhimova E., Wiehlmann L., Brauer A.L., Sethi S., Murphy T.F., Tümmler B. Pseudomonas aeruginosa population biology in chronic obstructive pulmonary disease. *J. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 200, no. 12, pp. 1928-1935.
34. Sawant D.V., Vignali D.A. Once a Treg, always a Treg? *Immunol. Rev.*, 2014, Vol. 259, no. 1, pp. 173-191.

35. Vasudev A., Ying C.T., Ayyadhury S., Puan K.J., Andiappan A.K., Nyunt M.S., Shadan N.B., Mustafa S., Low I., Rotzschke O., Fulop T., Ng T.P., Larbi A. γ/δ T cell subsets in human aging using the classical α/β T cell model. *J. Leukoc. Biol.* 2014, Vol. 96, no. 4, pp. 647-655.

36. Wark P.A., Tooze M., Powell H., Parsons K. Viral and bacterial infection in acute asthma and chronic obstructive pulmonary disease increases the risk of readmission. *Respirology*, 2013, Vol. 18, no. 6, pp. 996-1002.

37. Wen W., Wang A.M., Liu D.L., Zhang Y.B., Yao L.Q., Lai G.X. Expression of connective tissue growth factor and bone morphogenetic protein-7 in *Pseudomonas aeruginosa*-induced chronic obstructive pulmonary disease in rats. *COPD*, 2013, Vol. 10, no. 6, pp. 657-666.

Авторы:

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория общей иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; кафедра фундаментальной медицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Мошев А.В. — аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular & Cellular Physiology, and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular & Cellular Physiology, and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; School of Biomedicine, Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Moshev A.V., Postgraduate Student, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member of the Russian Academy of Sciences, Director, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 19.05.2015
Принята к печати 30.05.2015

Received 19.05.2015
Accepted 30.05.2015

ВЛИЯНИЕ ПРОБИОТИКОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СИСТЕМАХ *IN VITRO* И *IN VIVO*

**Аверина О.В.¹, Ермоленко Е.И.^{2,3}, Ратушный А.Ю.¹, Тарасова Е.А.²,
Борщев Ю.Ю.², Леонтьева Г.Ф.², Крамская Т.А.², Котылева М.П.^{2,3},
Даниленко В.Н.¹, Суворов А.Н.^{2,3}**

¹ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Исследовано влияние трех штаммов пробиотических бактерий: *Lactobacillus rhamnosus* K32 (L), *Bifidobacterium longum* GT15 (B), *Enterococcus faecium* L-3 (E), на уровне экспрессии и содержания ключевых цитокинов при помощи полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и иммуноферментного анализа соответственно.

В работе использованы культура клеток промоноцитарного происхождения (НТР-1) и экспериментальная модель дисбиоза кишечника. В геномах штаммов В и Е ранее были выявлены гены, кодирующие бактериоцины, гены компонентов внешней мембраны, пилей и экзополисахаридов, участвующих в модуляции иммунной системы.

При исследовании влияния пробиотических штаммов и их супернатантов на экспрессию цитокинов на культуре клеток выявлено увеличение экспрессии TNF α , обусловленное В, Е и супернатантом L. Культура В дополнительно вызывала экспрессию IL-8 и IL-10.

При коррекции дисбиоза кишечника у крыс (индуцированного метронидазолом и ампициллином) пробиотиками было показано, что нарушение в составе микробиоты (чрезмерный рост *Klebsiella* spp., низкое содержание *Faecalobacterium prausnitzii*) оставались у животных после введения L, как в контроле (без введения пробиотиков). В отличие от этих групп у крыс после введения Е и В были выявлены: 1) низкие уровни экспрессии провоспалительных цитокинов (IL-8, TNF α , MCP-1) в брыжеечных лимфатических узлах и содержание данных факторов в сыворотке крови; 2) увеличение содержания в сыворотке крови противовоспалительного цитокина TGF- β .

В данной работе, при помощи двух взаимодополняющих моделей, выявлены индивидуальные особенности иммуномодулирующих эффектов пробиотических штаммов *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 (B), *E. faecium* L-3, оказывающих различное влияние на микробиоту кишечника.

Ключевые слова: лактобациллы, бифидобактерии, энтерококки, дисбиоз, цитокины

Адрес для переписки:

Ермоленко Елена Игоревна
ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-05-42.
Факс: 8 (812) 234-94-77.
E-mail: lermolenko1@yandex.ru

Address for correspondence:

Ermolenko Elena I.
Research Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-05-42.
Fax: 7 (812) 234-94-77.
E-mail: lermolenko1@yandex.ru

Образец цитирования:

О.В. Аверина, Е.И. Ермоленко, А.Ю. Ратушный, Е.А. Тарасова, Ю.Ю. Борщев, Г.Ф. Леонтьева, Т.А. Крамская, М.П. Котылева, В.Н. Даниленко, А.Н. Суворов, «Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo*» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 443-454. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-443-454

© Аверина О.В. и соавт., 2015

For citation:

O.V. Averina, E.I. Ermolenko, A.Yu. Ratushniy, E.A. Tarasova, Yu.Yu. Borshev, G.F. Leontieva, T.A. Kramskaya, M.P. Kotyleva, V.N. Danilenko, A.N. Suvorov, "Influence of probiotics on cytokine production in the *in vitro* and *in vivo* systems", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 443-454. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-443-454

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-443-454>

INFLUENCE OF PROBIOTICS ON CYTOKINE PRODUCTION IN THE *IN VITRO* AND *IN VIVO* SYSTEMS

Averina O.V.^a, Ermolenko E.I.^{b,c}, Ratushniy A.Yu.^a, Tarasova E.A.^b, Borschev Yu.Yu.^b, Leontieva G.F.^b, Kramskaya T.A.^b, Kotyleva M.P.^{b,c}, Danilenko V.N.^a, Suvorov A.N.^{b,c}

^a N.I. Vavilov Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Modulatory effects of three probiotic bacterial strains (*Lactobacillus rhamnosus* K32 (L), *Bifidobacterium longum* GT15 (B), *Enterococcus faecium* L-3 (E)) on expression level and contents of key cytokines were studied using PCR techniques with reverse transcription, and enzyme-linked immunosorbent assay. Both cell cultures and an experimental model of intestinal dysbiosis were used in this study.

The genes encoding bacteriocins, surface membrane component, pili and exopolysaccharides involved in host immune system modulation were previously identified in the B and Ebacterial strains.

Investigation of probiotic strains and effects of their supernatants expression of cytokines in cell cultures of promonocyte origin (HTP-1) showed increased expression of TNF α , due to E and L supernatants. Moreover, the B1 culture induced IL-8 and IL-10 expression.

In a model of Wistar rats with ampicillin- and metronidazole-induced intestinal dysbiosis corrected with probiotics we have shown that the dysbiosis was accompanied by sufficient alterations in microbiota composition (*Klebsiella spp.* overgrowth and low contents of *Faecalobacterium prausnitzii*) that were observed only in the animals untreated with probiotics (control), or after administration of L.

In contrast to these results, the animals treated with E and B, the following changes were revealed: 1) low expression of proinflammatory cytokines IL-8, TNF α , MCP-1 in mesenteric lymph nodes and appropriate changes of their serum contents, 2) increased serum content of the anti-inflammatory TGF- β cytokine. Hence, the present study, having used two complementary models, has detected some individual features of immune modulation produced by the probiotic strains of *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3 which exert differential effects upon the intestinal microbiota.

Keywords: *Lactobacilli*, *Bifidobacteria*, *Enterococci*, *dysbiosis*, *cytokines*

Работа поддержана РФФИ (№ 13-04-01861) и Государственным контрактом (8418-7/2014).

Введение

К пробиотикам обычно относят лечебно-профилактические препараты, в состав которых чаще всего входят бифидобактерии, лактобациллы и энтерококки, «стабилизирующие многообразные функции микробиоты», в том числе и иммунные реакции организма [3, 30]. Показано, что пробиотики действуют на иммунную систему (врожденный и адаптивный иммунитет) прямо и опосредованно, изменяя микробиоту, восстанавливая морфофункциональные свойства отдельных органов и систем организма.

Оценка влияния пробиотических препаратов на иммунную систему особенно важна при коррекции дисбиозов и лечении воспалительных заболеваний кишечника, что во многом может предопределить успех в терапии других соматических заболеваний [38]. При изучении влияния отдельных пробиотических штаммов бактерий на иммунную систему было показано, что они обладают специфическим иммуномодулирующим действием, проявляющимся в индукции синтеза

одновременно про- и противовоспалительных цитокинов, избирательной активации или ингибирования синтеза отдельных цитокинов и их комбинаций [6, 24, 34]. Некоторыми авторами предложено разделение пробиотических штаммов по иммуномодулирующим эффектам на про- и противовоспалительные, «супрессивные и активирующие» [18, 23, 31].

В большинстве случаев при оценке суммарного воздействия пробиотиков (как и других факторов) на иммунную систему учитывается изменение в количественном соотношении популяций лимфоцитов, сопровождающееся увеличением продукции цитокинов, в том числе ключевых для каждого направления поляризации. Примерами таких цитокинов являются: IFN γ , TNF α , NF- κ B (Th1), IL-4, IL-13 (Th2), IL-17, IL-22 (Th17), IL-10, TGF- β , (Threg) [21, 33, 38].

Исследование иммуномодулирующей активности пробиотиков проводится чаще всего на клеточных культурах из клеток кишечника (Caco-2, HT-29) или иммунцитов (ЕС-6, THP-1)

[6, 11] и лабораторных животных (здоровых, с дефектами иммунной системы, гнотобионтов, а также с экспериментальной инфекционной и неинфекционной патологией желудочно-кишечного тракта) [6, 11, 36].

При исследовании влияния живых и разрушенных (прогреванием или ультрафиолетовым воздействием) пробиотических штаммов бактерий и их метаболитов на иммунитет анализируются особенности кластерной дифференцировки иммунокомпетентных клеток и уровень продукции цитокинов при помощи иммунологических и генетических методов [41]. Однако до сих пор не существует четких критериев сравнения иммуномодулирующих эффектов пробиотических бактерий. Особенности влияния отдельных пробиотических бактерий исследованы недостаточно, а результаты, полученные при оценке иммуномодулирующих свойств штаммов, трудно сопоставимы.

Целью данной работы было изучение влияния различных штаммов пробиотических бактерий на уровень экспрессии и продукции ключевых цитокинов с использованием двух моделей: культура клеток и экспериментальный дисбиоз кишечника у крыс.

Материалы и методы

Бактериальные штаммы

В работе использовали три пробиотических штамма: *Bifidobacterium longum* GT15, *Lactobacillus rhamnosus* K32 и *Enterococcus faecium* L-3.

Штамм *B. longum* GT15 выделен из содержимого кишечника здорового взрослого человека (г. Тверь), депонирован в GenBank (№SUB167727, 2 309 998 пар оснований и содержит 1954 генов) и в ВКПМ (Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов).

Штамм *L. rhamnosus* K32 выделен из содержимого кишечника здоровой девочки в возрасте 12 лет (г. Тверь), депонирован в GenBank (№SUB168082, 2 906 246 пар оснований содержит 2742 генов) и ВКПМ.

Штамм *E. faecium* L-3 выделен из сквашенного молока, депонирован в GenBank (№ SUB167269, размер 2 629 318 пар оснований содержит 2717 генов) и во Всероссийском НИИ сельскохозяйственной микробиологии, ND-79, патент РФ № 2220199.

Все штаммы культивировали на среде MRS бульон (HiMedia, Индия). Для культивирования штамма *B. longum* GT15 в среду добавляли L-цистеин до 0,05%. Культуру бактерий выращивали в анаэробном состоянии в HiAnaerobic System (HiMedia, Индия) при 37 °С в течение 18-24 часов до достижения плотности культуры 10⁹ КОЕ/мл. Уровень плотности бактериальных культур отслеживали при помощи измерения оптической плотности

при длине волны 600 нм на спектрофотометре (PD-303, Japan).

Для анализа экспрессии генов цитокинов в условиях *in vitro* использовали взвесь живых бактерий и супернатант. Супернатант получали посредством центрифугирования живой бактериальной культуры при 3500 об/мин в течение 15 минут. Затем супернатанты стерилизовали методом фильтрации (Filtropor 0,45 µm [Sarstedt, Германия]).

Клеточные линии

Клеточная линия ТНР-1 (выделенная при острой промиелоцитарной лейкемии) была получена из Российской коллекции клеточных культур позвоночных, Санкт-Петербург. Клетки культивировали в среде RPMI («ПанЭко», Россия) с 10% содержанием эмбриональной телячьей сыворотки («ПанЭко», Россия), 292 мг/л L-глутамин («ПанЭко», Россия), 25 мг пенициллина и 25 мг стрептомицина при температуре 37 °С в атмосфере с 5% CO₂.

В качестве индуктора иммунного ответа и активатора воспалительной реакции использовали липополисахарид (ЛПС) *Escherichia coli* 0127: B8 (Sigma-Aldrich, США).

Характеристика животных и условия их содержания

Эксперименты выполнены на 50 самцах крыс линии Вистар (вес 230-250 г в возрасте 6-7 недель), полученных из питомника в Рапполово. Содержание, питание, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии с требованиями «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР от 12.08.1977 г. № 755). Все животные содержались при сходных условиях в отношении температуры (18-22 °С), влажности (50-60%) и освещения (12 часов), шума (до 85 дБ) а также рациона питания (комбикорм ПК-120-1, Россия). Эксперименты проведены в полном соответствии с Директивой Европейского Совета (The European Council Directive 86/609/ЕЕС) по соблюдению этических принципов в работе с лабораторными животными и одобрены Комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных. Работа выполнялась в соответствии с Национальным стандартом РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (утв. и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. No 544-ст).

Коинкубация клеточной линии ТНР-1 с исследуемыми образцами

Коинкубацию клеток линии ТНР-1 с бактериальными культурами и их супернатантами проводили в 6-луночных планшетах на среде RPMI с L-глутамином (292 мг/л) и 10% эмбриональной телячьей сыворотки без антибиотика.

В лунку вносили 10^6 клеток линии ТНР-1 в 4 мл среды культивирования. Иммуномодулирующий эффект оценивали после индукции клеток липополисахаридом (ЛПС) в концентрации 50 нг/мл. ЛПС вносили в культуральную среду за 1 час до добавления бактериальной взвеси (из расчета конечной концентрации в лунке – 10^7 КОЕ/мл) или супернатанта (в количестве 1% от общего объема среды в лунке, 40 мкл).

Образцы инкубировали при 37 °С и 5% CO_2 в течение 2, 4 и 6 часов.

Экспрессия цитокинов для исследований в системе *in vitro*

Выделение РНК проводили согласно протоколу, прилагаемому к набору TRIzol (Изоген, Россия). После коинкубации эукариотических клеток с исследуемыми образцами бактерий среду культивирования удаляли при помощи центрифугирования и добавляли к клеткам тризол (Изоген, Россия) в объеме 400 мкл.

Концентрацию выделенной РНК измеряли с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США) с использованием набора реагентов Qubit RNA Assay Kit (Invitrogen, США). Количество РНК выравнивали и подвергали воздействию ДНКаз (BioLabs, США) в соответствии с указаниями производителя.

Обратную транскрипцию проводили с помощью набора реагентов GenPak RT Core (Изоген, Россия) согласно указаниям производителя.

Для оценки экспрессии генов цитокинов был использован метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ). ПЦР-РВ в присутствии SYBR Green I (Синтол, Россия) проводили на приборе CFX96 Real-Time System (BIO-RAD, USA). Образцы кДНК нормировали по контрольному гену *GAPDH*. В качестве контроля использовали экспрессию цитокинов в клетках, индуцированных ЛПС, без добавления бактериальных образцов.

Последовательности используемых праймеров (Литех, Россия) для ПЦР представлены в таблице 1.

Экспериментальная модель дисбиоза и дизайн исследования

В работе использована разработанная нами ранее модель экспериментального дисбиоза (Ермоленко и др., 2009), вызванного внутрижелудочным введением крысам (самцы, Вистар) 75 мг/кг ампициллина (ОАО «Органика», Россия) и 50 мг/кг метронидазола (ОАО «Ирбитский химико-фармацевтический завод», Россия). Животные были разделены на 5 групп, по 10 крыс в каждой (табл. 2).

Антимикробные препараты вводили ежедневно в течение трех дней животным из 4 групп (L, B, E и K1). Крысы из второй контрольной группы (K2) получали первые три дня дистиллированную воду. После этого в течение 5 дней крысам из групп L, B и E вводили, соответственно, *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3, по $5,5 \times 10^8$ КФЕ/мл бактерий каждого вида. Животные из контрольных групп получали фосфатный буфер. Все вводимые препараты и дистиллированную воду вводили внутрижелудочно в объеме 0,5 мл. В последний день эксперимента собирали пробы фекалий для бактериологического и генетического исследований микробиоты кишечника, при этом использовали описанный ранее культуральный метод [16] и ПЦР-РВ с использованием реагентов для выделения ДНК (QIAamp DNA Stool Mini Kit, США, Интерлаб-сервис) и комплекта реагентов «Колонофлор» ООО «Альфалаб».

На заключительном этапе исследования животных декапетировали, отбирали кровь для получения сыворотки, выделяли лимфатические узлы брыжейки для дальнейшей оценки иммуномодулирующих свойств пробиотических штаммов.

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЦИТОКИНЫ, *IN VITRO*

Название праймеров	Олигонуклеотидные последовательности		Размер ПЦР продукта (нп)
	Прямой праймер	Обратный праймер	
IL-8	5'GGCACAAACTTTCAGAGACAG5'	5'ACACAGAGCTGCAGAAATCAGG3'	153
IL-10	5'TCAGGGTGGCGACTCTAT 3'	5'TGGGCTTCTTCTAAATCGTTC3'	198
TNF α	5'TCTCGAACCCCGAGTGACAA 3'	5'TATCTCTCAGCTCCACGCCA 3'	124
GAPDH*	5'GGAGTCAACGGATTTGGTCCG3'	5'TGAGGTCAATGAAGGGGTCA3'	103

Примечание. * GAPDH – glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

ТАБЛИЦА 2. ДИЗАЙН ИССЛЕДОВАНИЯ

Группы	1-3-й дни	3-8-й дни	9-й день
L	Метронидазол + ампициллин	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> K32	Взятие материала: мезентериальные узлы, кровь и фекалии
B	Метронидазол + ампициллин	<i>Bifidobacterium longum</i> GT15	
E	Метронидазол + ампициллин	<i>Enterococcus faecium</i> L-3	
K1	Метронидазол + ампициллин	+ вода + фосфатный буфер	
K2	+ вода	+ вода + фосфатный буфер	

ТАБЛИЦА 3. ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ДЛЯ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОДИРУЮЩИХ ЦИТОКИНЫ, *IN VIVO*

Название праймеров	Олигонуклеотидные последовательности		Размер ПЦР продукта (нп)
	Прямой праймер	Обратный праймер	
IL-8	5'CCACGCCACAAGTACACTGAT3'	5'TGGTTCTCATGAGGGTGTCTG 3'	393
IL-10	5'TGGGTTGCCAAGCCTTGT 3'	5'ATCGATGACAGCGTCGCA 3'	152
TNF α	5'TTCCCAAATGGGCTCCCTC3'	5'GGCTTGTCACTCGAGTTTT3'	83
β -актин	5'GAAGATCCTGACCGAGCGTG3'	5'AGCACTGTGTTGGCATAGAG 3'	326

Экспрессия генов, кодирующих цитокины, в мезентеральных узлах крыс

Для выделения тотальной РНК из мезентеральных узлов использовали RNeasy Mini Kit («Qiagen», Германия). Уровень экспрессии мРНК цитокинов определяли методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией (ОТ-ПЦР) с праймерами, которые были специально сконструированы (табл. 3). В качестве внутреннего стандарта для оценки прохождения реакции обратной транскрипции использовали мРНК β -актина. Продукты ПЦР анализа визуализировали методом электрофореза в 2% агарозном геле. Полуколичественную оценку уровня экспрессии генов, обеспечивающих продукцию цитокинов, проводили с помощью компьютерной программы «Scion Image» и выражали в условных единицах.

Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови крыс

Концентрации цитокинов: MCP-1 (Monocyte Chemoattractant Protein 1), TNF α (Tumor necrosis factor), TGF- β (Transforming growth factor beta), IL-8 и IL-10 в сыворотке крови крыс определяли при помощи иммуноферментного анализа (ИФА), тест-системы с моноклональными антителами, eBioscience, Bender MedSystems, USA.

Статистический анализ

Данные представлены в виде средних значений \pm стандартные отклонения. Для подтверждения различий между образцами использовали критерий Манна-Уитни. Каждая выборка включает не менее трех независимых повторностей. При статистическом анализе результатов исследования применяли программы «Microsoft® Office Excel 97» с использованием t-критерия Стьюдента (уровень значимости $p < 0,05$).

Результаты

Сравнительное исследование влияния пробиотических штаммов *Bifidobacterium longum* GT15, *Lactobacillus rhamnosus* K32 и *Enterococcus faecium* L-3 на иммунную систему проводили, используя моноцитоподобную клеточную культуру и модель кишечного дисбактериоза, анализируя уровни экспрессии ключевых про- и противовоспалительных цитокинов. При исследовании в системе *in vivo* также оценивалось содержание цитокинов в сыворотке крови крыс при помощи ИФА.

Оценка экспрессии цитокинов на культуре клеток

Иммуномодулирующий эффект исследуемых штаммов оценивался на линии клеток ТНР-1 после индукции ЛПС. Изучалось влияние живых бактериальных клеток и супернатантов их культур на экспрессию генов цитокинов IL-8, IL-10, TNF α через 2, 4 и 6 часов коинкубации. Полученные профили экспрессии цитокинов на уровне мРНК представлены на рисунке 1.

У штамма *B. longum* GT15 выявлена иммуномодулирующая активность, проявляемая в индукции экспрессии как противовоспалительного цитокина IL-10, так и провоспалительных цитокинов IL-8 и TNF α с постепенным увеличением в течение всего времени коинкубации клеток (рис. 1А). Наибольшая экспрессия цитокинов наблюдалась при коинкубации ТНР-1 клеток с живыми клетками бифидобактерий, причем максимально она проявилась в случае TNF α через 6 часов коинкубации.

Штамм *L. rhamnosus* K32 вызывал экспрессию противовоспалительных цитокинов TNF α и IL-8 только к 6 часам коинкубации ТНР-1 клеток со взвесью живых бактерий (рис. 1Б). Воздействие супернатанта лактобацилл приводило к увеличению экспрессии TNF α в течение всего периода коинкубации (2, 4 и 6 ч), однако было в 2 раза меньше, чем при воздействии супернатанта бифидобактерий и в 5-10 раз уступало показателям экспрессии генов, кодирующих TNF α после контакта с живыми *B. longum* GT15.

Выраженный эффект на индукцию TNF α продемонстрировали живые клетки штамма *E. faecium* L-3 (рис. 1В). Существенное возрастание индукции продукции данного цитокина было обнаружено уже после двух часов коинкубации ТНР-1 клеток с живыми энтерококками, и показатели экспрессии данного цитокина были сопоставимы по величине с данными, полученными при исследовании живых бифидобактерий. В то же время, в отличие от последних, *E. faecium* незначительно увеличивали экспрессию IL-8 и IL-10, а супернатант культуры энтерококка практически не оказывал влияния на экспрессию анализируемых цитокинов.

Оценка иммуномодулирующего эффекта пробиотиков при коррекции дисбиоза

Дисбиоз кишечника крыс был индуцирован введением антимикробных препаратов. В дальнейшем проводилось сравнение микробиоты

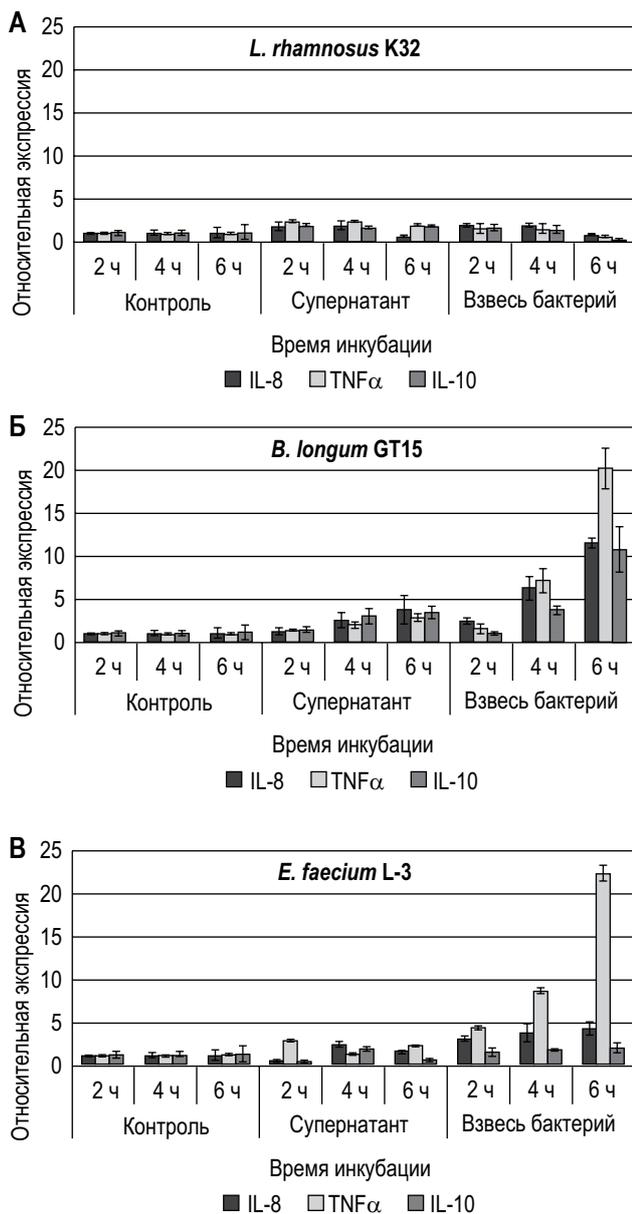


Рисунок 1. Изменение экспрессии генов цитокинов в клетках линии THP-1 при коинкубации с супернатантом и взвесью бифидобактерий (А), лактобацилл (Б) и энтерококков (В) через 2, 4 и 6 часов

Примечание. Данные представлены в виде средних значений для трех экспериментов \pm стандартные отклонения. Для подтверждения различий между образцами использовали критерий Манна–Уитни ($P < 0,05$).

и цитокинового статуса на 9-й день исследования животных различных групп, которым вводили лактобациллы, бифидобактерии или энтерококки с целью коррекции нарушений микробиоты. Контрольные здоровые (К1) или животные с дисбиозом кишечника (К2) не получали пробиотиков.

Изменения микробиоты

При сравнении состава микробиоты после приема пробиотических бактерий при помощи

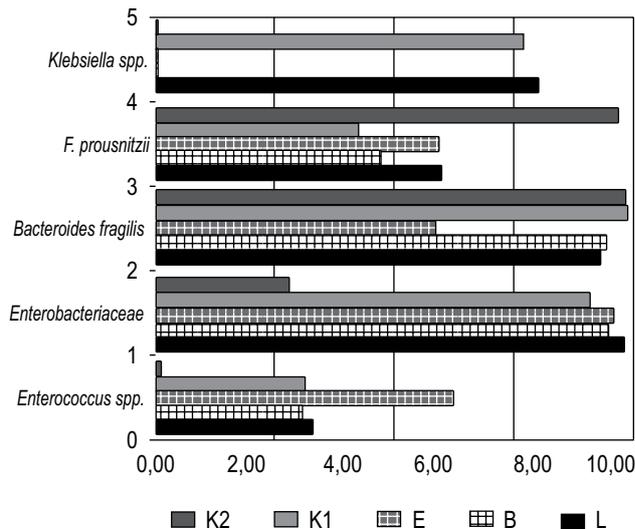


Рисунок 2. Количественное содержание отдельных представителей микробиоты после введения пробиотиков крысам с кишечным дисбиозом

Примечание. Представлены результаты исследования фекалий методом ПЦР в режиме реального времени.

По оси абсцисс: содержание бактерий в lg КОЕ/г. Группа К1 – после введения антимикробных препаратов и фосфатного буфера. Группа К2 – интактные животные (введены вода, затем фосфатный буфер). Группы Группы L, В и Е – после введения антимикробных препаратов, животные получали пробиотики: *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 или *E. faecium* L-3, соответственно.

ПЦР-РВ и культуральных методов не удалось выявить различий в содержании лактобацилл и бифидобактерий в кишечнике животных, их количество незначительно варьировало в пределах 9,0-10,0 lg КОЕ/г. Однако были обнаружены различия между группами по другим видам бактерий (рис. 3). Так, содержание *Enterococcus sp.* в фекалиях группы Е было на 1,0-1,2 lg КОЕ/г больше, чем у остальных животных. Важно также, что у крыс из группы К1 отмечался высокий уровень содержания грамотрицательных бактерий, принадлежащих к семейству *Enterobacteriaceae* (*Enterobacter sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Klebsiella sp.* и атипичных эшерихий). После воздействия пробиотических штаммов содержание этих бактерий было низким, и только в группе L были обнаружены клебсиеллы в количестве более 5,3 lg КОЕ (как и в группе К1). В то же время обращало на себя внимание снижение количества представителя семейства *Clostridiaceae* *Faecalobacterium prousnitzii* в фекалиях у всех крыс по сравнению с группой К2. Было выявлено высокое (8,1-9,0 lg КОЕ/г) содержание этих бактерий в группе К2 и лишь частичное восстановление (2,2-6,0 lg КОЕ/г) после отмены антимикробных препаратов у остальных крыс. У животных, получавших лактобациллы и энтерококки, содержание *F. prousnitzii* было выше, чем в группах В и К1

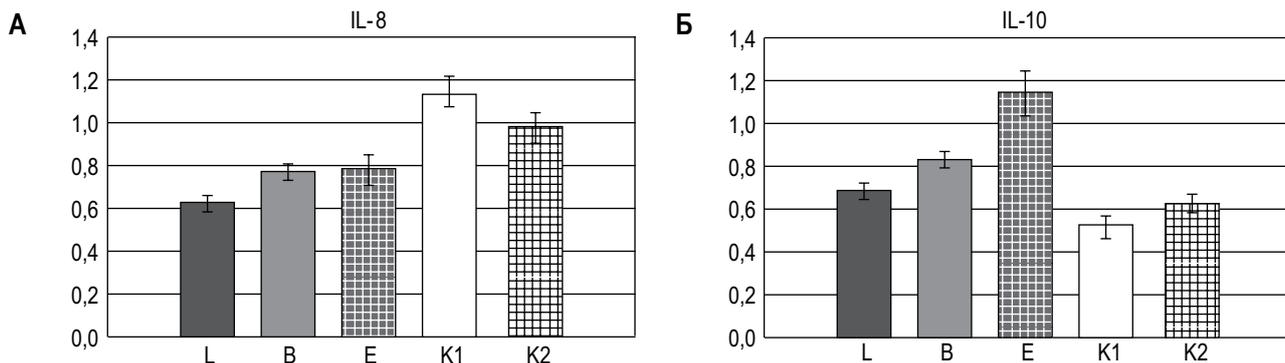


Рисунок 3. Уровень экспрессии IL-8 (А) и IL-10 (Б) в брыжеечных узлах крыс различных групп

Примечание. По оси ординат: IL-8/ β актин, IL-10/ β актин в условных единицах. Группа K1 – после введения антимикробных препаратов и фосфатного буфера. Группа K2 – интактные животные (введены вода, затем фосфатный буфер). Группы L, B и E – после введения антимикробных препаратов, животные получали пробиотики: *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 или *E. faecium* L-3, соответственно.

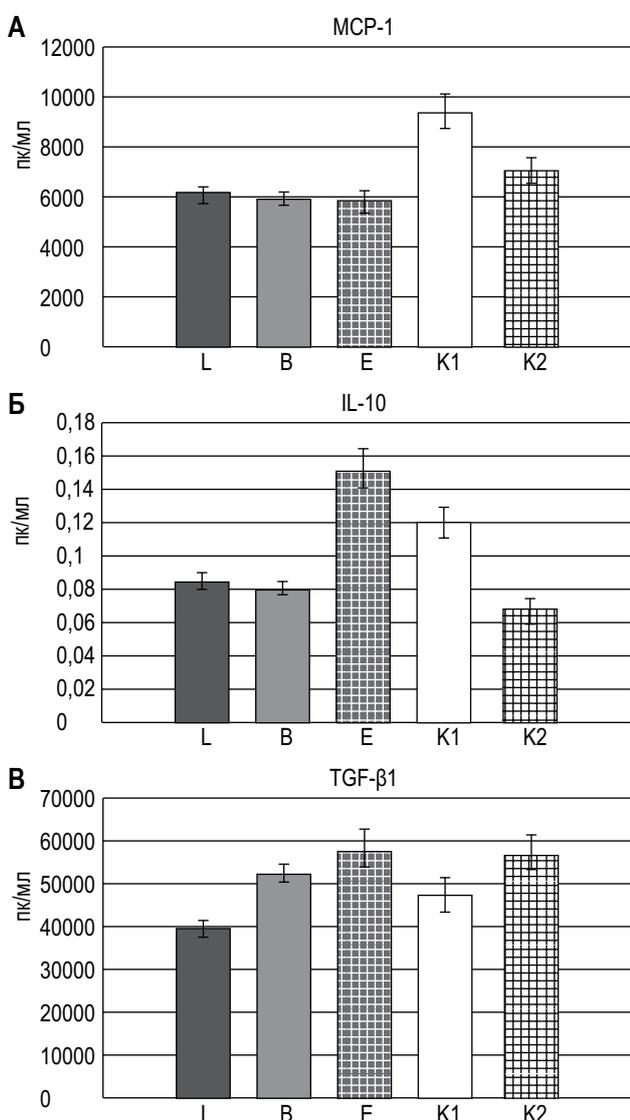


Рисунок 4. Содержание в сыворотке крови крыс различных групп MCP-1 (А), IL-10 (Б), TGF- β 1 (В)

Примечание. Группа K1 – после введения антимикробных препаратов и фосфатного буфера. Группа K2 – интактные животные (введены вода, затем фосфатный буфер). Группы L, B и E – после введения антимикробных препаратов, животные получали пробиотики: *L. rhamnosus* K32, *B. longum* GT15 или *E. faecium* L-3, соответственно.

(рис. 2). Также было отмечено снижение количества *Bacteroides fragilis* после введения энтерококков.

Экспрессия цитокинов в мезентериальных узлах

В данном исследовании для оценки иммуномодулирующих свойств пробиотических бактерий по аналогии с анализом в системе *in vitro* проводилась оценка экспрессии генов, обеспечивающих продукцию трех цитокинов: TNF α , IL-8 и IL-10.

При помощи ОТ-ПЦР показано (рис. 3А), что экспрессия IL-8 достоверно увеличивалась только в группе K1. Стимуляция продукции TNF α происходила во всех группах в одинаковой степени (данные не показаны).

В то же время выявлена более выраженная экспрессия генов, кодирующих IL-10 в клетках мезентериальных узлов крыс, получающих энтерококки и бифидобактерии (рис. 3Б).

Исследование содержания цитокинов в сыворотке крови

При исследовании содержания цитокинов в сыворотке после воздействия различных пробиотических штаммов (рис. 4) были выявлены различия при сравнении как с контрольными группами, так и при анализе проб, взятых из групп L, B, E. Маркер воспаления цитокин MCP-1 был выявлен в высоких концентрациях только в группе K1, у животных, не получавших пробиотик. Максимальное содержание противовоспалительных цитокинов было выявлено в группе E (IL-10) и TGF- β группы E и B.

Обсуждение

В данной работе проведено сравнительное исследование иммуномодулирующих свойств пробиотических штаммов *Bifidobacterium longum* GT15, *Lactobacillus rhamnosus* K32 и *Enterococcus faecium* L-3. Геномы всех трех исследуемых штаммов полностью просеквенированы и депонированы в GenBank, что важно для изучения природы тонкого взаимодействия этих бактерий с организмом млекопитающих и его микро-

биотой при лечении различных заболеваний. В штаммах *B. longum* GT15 в геноме выявлены гены, обеспечивающие продукцию бактериоцинов (epicidin 280), а также гены компонентов внешней мембраны, пилей и экзополисахаридов, участвующие в модуляции иммунной системы [12, 13, 17, 19].

В геноме штамма *E. faecium* L-3 также обнаружены гены, обеспечивающие продукцию бактериоцинов (А, В, EpxA, EpxB и лактобина), четырех белков, участвующих в синтезе энтерококковых экзополисахаридов и четырех белков, необходимых для формирования фимбрий. В геноме *Lactobacillus rhamnosus* K32 не удалось обнаружить генов, кодирующих ранее описанные бактериоцины и поверхностные белки с иммуномодулирующими свойствами.

Наличие перечисленных генов антимикробных пептидов, у исследуемых в данной работе штаммов бифидобактерий и энтерококков, вероятно, обеспечивало проявление их высокой антимикробной активности по отношению к микроорганизмам, заселяющим кишечник при дисбиозе. Представители микробиоты, а также сами пробиотические бактерии, у которых выявлен ряд генов, кодирующих белки, способные взаимодействовать с рецепторами иммунной системы или регуляторными молекулами, по-видимому, оказывают существенное влияние на иммунную систему организма хозяина. Это было доказано в настоящей работе при оценке воздействия рассматриваемых пробиотических штаммов бактерий на продукцию цитокинов, на двух взаимодополняющих моделях: культуры ткани человека и лабораторных животных (крыс) с индуцированным дисбиозом.

Важнейшая роль цитокинов в регуляции иммунного ответа к настоящему времени хорошо изучена и доказана. Так, повышение концентрации провоспалительных IL-1, IL-6, IL-8, TNF α цитокинов играет ведущую роль в иммунной регуляции и коррелирует с наличием кишечной патологии [9, 10, 39]. Увеличение продукции IL-10 имеет существенное значение в сохранении кишечного гомеостаза, вызывает супрессию адаптивного и врожденного иммунных ответов, участвует в тонкой регуляции взаимоотношений между отдельными звеньями иммунной системы [25].

В качестве сравнительно простой модельной тест-системы для изучения иммуномодулирующих свойств пробиотических штаммов была выбрана линия клеток ТНР-1. Она представляет собой промоноциты, выделенные при острой промоноцитарной лейкемии человека, способные дифференцироваться в макрофаги или дендритные клетки [2, 42]. ТНР-1 линия клеток дает выраженное изменение в экспрессии цитокинов в ответ на стимуляцию провоспалительным фактором, ЛПС (компонент клеточной стенки грамотрицательных бактерий). ТНР-1 клетки имеют

большое сходство с популяцией макрофагов в желудочно-кишечном тракте, реагирующих на присутствие бактерий и регулирующих иммунные реакции организма. Схожий набор рецепторов и способность продуцировать те же цитокины, что и макрофаги позволяют использовать линию ТНР-1 для выявления *in vitro* иммуномодулирующей активности у пробиотических бактерий [6, 7].

В представленной работе проведено изучение способности пробиотических бактерий *B. longum* GT15, *L. rhamnosus* K32, *E. faecium* L-3 индуцировать экспрессию цитокинов IL-8, TNF α и IL-10 в клетках ТНР-1 на фоне воздействия ЛПС стимулирующего в системе *in vivo* воспалительные реакции за счет взаимодействия с TLR4 рецепторами эукариотических клеток.

Наиболее выраженное иммуномодулирующее действие в рамках используемой тест-системы оказывали суспензии живых бактерий *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3. Воздействие живых *B. longum* GT15 приводило к увеличению экспрессии одновременно IL-8, TNF α и IL-10 цитокинов, а *E. faecium* L-3 – к увеличению количества мРНК, кодирующей TNF α . Культура лактобацилл оказывала слабый эффект, в отличие от ее супернатанта, проявившего слабое, но статистически достоверное стимулирующее действие на продукцию TNF α .

Условия проведения эксперимента с исследованием динамики экспрессии цитокинов в течение 2, 4 и 6 часов коинкубации пробиотиков с индуцированной ЛПС культурой клеток позволили выявить зависимость иммунных реакций от времени воздействия пробиотиков. В данных условиях воздействие было кратковременным, и эффект пробиотиков к 6 часам наблюдений продолжал нарастать. Ранее уже было отмечено, что на специфический иммуномодулирующий эффект пробиотиков в системе *in vitro* оказывают влияние культуры клеток, каждая из которых может в большей степени продуцировать специфические цитокины [4, 26, 37]. Также было указано, что важное значение для оценки влияния пробиотиков на иммунный ответ имеют продолжительность, условия коинкубации, внесенная доза и фаза роста пробиотической культуры [8, 14, 27, 41].

В ходе исследования был выявлен феномен одновременной стимуляции *B. longum* GT15 про- и противовоспалительных цитокинов. Это согласуется с данными, полученными в работе Medina et al. [28], в которой было показано, что живые клетки всех изученных штаммов *B. longum* вызывали значительное повышение продукции IL-10 и TNF α в мононуклеарных клетках периферической крови. Аналогичный феномен был отмечен при исследовании иммуномодулирующих эффектов некоторых штаммов энтерококков, лактобацилл и бифидобактерий на экспериментальных моделях и при терапии различных

заболеваний, что отражено в ряде публикаций и обзоров [4, 14, 26, 35, 37]. Он может быть объяснен многофункциональностью действия каждого из цитокинов и сложностью регуляторных реакций при иммунном ответе, в том числе в ответ на введение пробиотиков.

Энтерококки и продукты метаболизма лактобацилл в системе *in vitro* стимулировали только экспрессию одного из самых многофункциональных провоспалительных цитокинов TNF α , синтезируемого в основном моноцитами и макрофагами. Этот цитокин активирует универсальный фактор транскрипции NF- κ B, контролирующий экспрессию генов иммунного ответа, апоптоза и клеточного цикла. Нельзя исключить, что выявленное в системе *in vitro* увеличение экспрессии TNF α , обусловленное бифидобактериями, энтерококками и метаболитами лактобацилл, а в случае с бифидобактериями дополнительная экспрессия IL-8 и IL-10, происходит и в условиях *in vivo*, как проявление феномена «физиологического воспаления кишечника». В основе этого феномена лежит слабая, но устойчивая стимуляция провоспалительных цитокинов для подготовки эпителия кишечника к возможному взаимодействию с потенциально патогенными микроорганизмами.

Несколько иную картину влияния пробиотиков на иммунитет можно получить при проведении исследований на лабораторных животных, контролируя их воздействие на организм и его микробиоту. Известно, что и сама микробиота, которая трактуется в настоящее время как новый сателлитный орган [10], и пробиотические бактерии своими рецепторами, компонентами поверхностных структур, метаболитами, секретруемыми неповрежденными клетками и высвобождающимися при их гибели, оказывают мощное воздействие на иммунную систему.

В работе была использована модель экспериментального антибиотико-ассоциированного дисбиоза кишечника у крыс [16]. Воздействие ампициллином и метронидазолом приводило к нарушениям в составе микробиоты кишечника крыс, компенсация которых после введения различных пробиотиков и частично происходящая спонтанно была неравноценной. Так, чрезмерный рост грамотрицательных бактерий, и прежде всего клебсиелл, был отмечен только у животных, не получавших пробиотиков (группа K2) или после воздействия лактобацилл. Возможно, низкая антагонистическая активность *L. rhamnosus* K32 по отношению к энтеробактериям связана с отсутствием у этих лактобацилл, в отличие от бактериоциногенных штаммов пробиотических энтерококков и бифидобактерий, способности продуцировать антимикробные пептиды, ингибирующие рост клебсиелл и других грамотрицательных бактерий.

Особого внимания заслуживают *F. prausnitzii*, комменсал кишечника млекопитающих, наличие которого многие авторы связывают с благоприятным прогнозом в развитии и течении неспецифического язвенного колита и болезни Крона [29, 32]. Выявлена корреляция между наличием в желудочно-кишечном тракте млекопитающих *F. prausnitzii* (так же как *Butyricicoccus pullicaecorum* и других продуцирующих бутират бактерий) и снижением уровня TNF α и IL-8, а также увеличением продукции IL-10 [15, 29]. Следовательно, можно предположить, что одной из причин проявления противовоспалительного эффекта *B. longum* GT15 и *E. faecium* L-3 является их действие на микробиоту, при котором было отмечено увеличение содержания *F. prausnitzii*. Обращало на себя внимание отсутствие стимуляции энтерококками продукции IL-10 при кратковременном воздействии на культуру макрофагоподобных клеток.

Влияние *E. faecium* L-3 в системе *in vivo* оказалось более эффективным. Это проявилось в более выраженной, чем в остальных группах животных (исключая группу В), экспрессии генов, кодирующих данный цитокин, в брыжеечных узлах крыс групп В и Е и высоком содержании IL-10 в сыворотке животных группы Е.

О проявлении противовоспалительного эффекта штаммов *E. faecium* L-3 и *B. longum* GT15 при введении животным после индукции дисбиоза свидетельствовали: низкий уровень экспрессии и содержания в сыворотке провоспалительных цитокинов IL-8, TNF α , MCP-1, а также увеличение в сыворотке крови крыс из группы Е и В противовоспалительного цитокина TGF- β .

Исследование иммуномодулирующих эффектов пробиотиков на модели экспериментального дисбиоза позволило дать более объективную картину иммунного ответа при сравнительно длительном воздействии пробиотиков. Это было не 6-часовое наблюдение при коинкубации пробиотиков с макрофагоподобными клетками, а 5-дневное воздействие на желудочно-кишечный тракт, кишечную микробиоту и на весь организм в целом. Принципиально важным является возможность попадания биологически активных субстанций (короткоцепочечных жирных кислот, участков ДНК, коротких пептидов экзополисахаридов и других потенциальных иммуностимулирующих молекул) в кровотоки [20].

С использованием культуры клеток и модели экспериментального кишечного дисбиоза показано, что пробиотические бактерии могут поддерживать баланс про- и противовоспалительных цитокинов, предупреждая интенсивный воспалительный ответ на собственное присутствие и проявляя антагонистическую активность по отношению к патогенным микроорганизмам. Особенности описанных эффектов и полиари-

зация иммунного ответа в сторону стимуляции иммунных реакций или их ингибирования являются штаммоспецифичными. Они могут быть оценены в полной мере только при комплексном подходе с использованием различных условий проведения взаимодополняющих друг друга экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

В данной работе выявлены индивидуальные особенности иммуномодулирующих эффектов трех пробиотических штаммов, оказывающих неодинаковое влияние на микробиоту кишечника. Выявленные особенности их иммуномодулирующего действия позволяют предположить, что штаммы *E. faecium* L-3 и *B. longum* GT15 могут

быть рассмотрены как эффективные терапевтические препараты для обеспечения коррекции аутоиммунных, аллергических нарушений иммунной системы, а в случае возникновения дисбиотических состояний как средства, способствующие быстрому восстановлению микробиоты и стабилизации гомеостаза организма.

Возможно, использование подобных пробиотиков, индуцирующих продукцию ИЛ-10 клетками организма хозяина, станет альтернативой применению рекомбинантных пробиотических штаммов лактобацилл и лактококков, в геном которых введены гены, обеспечивающие его продукцию [22, 40].

Список литературы / References

1. Бельтюков П.П., Абдурасулова И.Н., Тарасова Е.А., Суворов А.Н., Захарова Е.Т., Соколов А.В., Карпенко М.Н., Ермоленко Е.И. Исследование влияния пробиотических эшерихий и энтерококков на иммунную систему здоровых крыс // Ученые записки Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова, 2009. Вып. 16, № 2. С. 54-58. [Belyukov P.P., Abdurasulova I.N., Tarasova E.A., Suvorov A.N., Zakharova E.T., Sokolov A.V., Karpenko M.N., Ermolenko E.I. Influence of probiotic *Escherichia* and *Enterococci* on the immune system of healthy rats. *The Record of the I.P. Pavlov St. Petersburg State Medical University*, 2009, Vol. 16, no. 2, pp. 54-58. (In Russ.)]
2. Волошина Е.В., Зубова С.В., Прохоренко С.В. Сравнение эффектов разных хемотипов липополисахаридов *Escherichia coli* и *Salmonella* на синтез TNF α и IL-6 макрофагоподобными клетками ТНР-1 // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 6. С. 509-514. [Voloshina E.V., Zubova S.V., Prokhorenko S.V. A comparison of different lipopolysaccharide chemotypes from *Escherichia coli* and *Salmonella* upon synthesis of TNF α and IL-6 by macrophage-like ТНР-1 cells. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 6, pp. 509-514. doi: 10.15789/1563-0625-2009-6-509-514 (In Russ.)]
3. Грачева Н.М., Бондаренко В.М. Пробиотические препараты в терапии и профилактике дисбактериоза кишечника // Инфекционные болезни, 2004. № 2. С. 53-58. [Gracheva N.M., Bondarenko V.M. Probiotics in therapy and prevention of intestinal dysbiosis. *Infectioznyye bolezni = Infectious Diseases*, 2004, no. 2, pp. 53-58. [In Russ.]]
4. Ермоленко Е.И. Иммуномодулирующее действие пробиотических бактерий при заболеваниях желудочно-кишечного тракта // Вестник Санкт-Петербургского университета, Серия 11: Медицина, 2014. Вып. 4. С. 5-18. [Ermolenko E.I. Immunomodulatory effect of probiotic bacteria in case of the diseases of gastrointestinal tract. *Bulletin of St. Petersburg State University*, 2014, Vol. 4, pp. 5-18. (In Russ.)]
5. Ермоленко Е.И., Донец В.Н., Дмитриева Ю.В., Ильясов Ю.Ю., Суворова М.А., Громова Л.В. Влияние пробиотических энтерококков на функциональные характеристики кишечника крыс при дисбиозе, индуцированном антибиотиками // Вестник Санкт-Петербургского университета, Серия 11: Медицина, 2009. Вып. 1. С. 157-167. [Ermolenko E.I., Donets V.N., Dmitrieva Y.V., Ilyasov Yu.Yu., Suvorov M.A., Gromova L.V. Influence of probiotic enterococci on functional characteristics of rat bowel under disbiosis induced by antibiotics. *Bulletin of St. Petersburg State University*, 2009, Vol. 1, pp. 157-167. (In Russ.)]
6. Федорова И.А., Даниленко В.Н. Иммуногенные свойства пробиотического компонента микробиоты желудочно-кишечного тракта человека // Успехи современной биологии, 2014. Т. 134, № 2. С. 99-110. [Fedorova I.A., Danilenko V.N. Immunogenic Properties of a Probiotic Component of the Human Gastroenteric Tract Microbiota. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2014, Vol. 134, no. 2, pp. 99-100. (In Russ.)]
7. Auwerx J. The human leukemia cell line, THP-1: a multifaceted model for the study of monocyte-macrophage differentiation. *Experientia*, 1991, Vol. 47, pp. 22-31.
8. Baken K.A., Ezendam J., Gremmer E.R., de Klerk A., Pennings J.L.A., Matthee B., Peijnenburg A.A.C.M., van Loveren H. Evaluation of immunomodulation by *Lactobacillus casei* Shirota: Immune function, autoimmunity and gene expression. *Int. J. Food Microbiol.*, 2006, Vol. 112, no. 1, pp. 8-18.
9. Bassaganya-Riera J., Viladomiu M., Pedragosa M., De Simone C., Carbo A., Shaykhtudinov R., Jobin C., Arthur J.C., Corl B.A., Vogel H., Storr M., Hontecillas R. Immunoregulatory mechanisms underlying prevention of colitis-associated colorectal cancer by probiotic bacteria. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 4, e34676.
10. Bengmark S. Gut microbiota, immune development and function. *Pharmacological Research*, 2013, Vol. 69, pp. 87-113.
11. Caselli M., Vaira D., Cassol F., Calò G., Vaira G., Papini F., Holton J. Recombinant probiotics and their potential in human health. *Int. J. Probiotics Prebiotics*, 2012, Vol. 7, pp. 53-58.

12. Collado M.C., Gueimonde M., Hernández M.S., Salminen S. Adhesion of selected Bifidobacterium strains to human intestinal mucus and the role of adhesion in enteropathogen exclusion. *Journal of Food Protection*, 2005, Vol. 12, pp. 2502-2720.
13. Cronin, M., Ventura M., Fitzgerald G.F. and van Sinderen D. Progress in genomics, metabolism and biotechnology of bifidobacteria. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, Vol. 149, pp. 4-18.
14. de Moreno de LeBlanc, A., LeBlanc J. G., Perdigon, G., Miyoshi, A., Langella P., Azevedo V., Sesma, F. Oral administration of a catalase-producing *Lactococcus lactis* can prevent a chemically induced colon cancer in mice. *J. Med. Microbiol.*, 2008, Vol. 57, pp. 100-105.
15. Eeckhaut V., Machiels K., Perrier C., Romero C., Maes S., Flahou B., Steppe M., Haesebrouck F., Sas B., Ducatelle R., Vermeire S., Van Immerseel F. *Butyricoccus pullicaecorum* in inflammatory bowel disease. *Gut*, 2013, Vol. 62, no. 12, pp. 1745-1752.
16. Ermolenko E., Gromova L., Borschev Y., Voeikova A., Ermolenko K., Gruzdkov A., Suvorov A. Influence of different probiotic lactic acid bacteria on microbiota and metabolism of rats with dysbiosis. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2013, Vol. 32, no. 2, pp. 41-49.
17. Fanning S., Hall L.J., Cronin M., Zomer A., MacSharry J., Goulding D., Motherway M.O., Shanahan F., Nally K., Dougan G., van Sinderen D. Bifidobacterial surface-exopolysaccharide facilitates commensal-host interaction through immune modulation and pathogen protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, Vol. 109, no. 6, pp. 2108-2113.
18. Foligne B. A Key Role of Dendritic Cells in Probiotic Functionality. *PLoS One*, 2007, Vol. 2, no. 3, e313.
19. Foroni E., Serafini F., Amidani D., Turroni F., He F., Bottacini F., O'Connell M.M., Viappiani A., Zhang Z., Rivetti C., van Sinderen D., Ventura M. Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiol. Cell Factories*, 2011, Vol. 10, pp. 1-13.
20. Galdeano C.M., de Moreno de Blance A., Vinderola G., Bonet M.E., Perdigon G. Proposed model: mechanisms of immunomodulation induced by probiotic bacteria. *Clinical and Vaccine Immunology*, 2007, Vol. 14, no. 5, pp. 484-492.
21. Hardy H., Harris J., Lyon E., Beal J., Foey A.D. Probiotics, Prebiotics and Immunomodulation of Gut Mucosal Defences: Homeostasis and immunopathology. *Nutrients*, 2013, Vol. 5, pp. 1869-1912.
22. Huijbregtse I.L., Zaat S.A., Kapsenberg M.L., Maria A. Sartori da Silva M.A.S., Peppelenbosch M.P., Sander J.H., van Deventer S.J.H., Braat H. Genetically modified *Lactococcus lactis* for delivery of human interleukin-10 to dendritic cells. *Gastroenterology Research and Practice*, 2012, Article ID 639291, 7 p.
23. Jones S. and Versalovic J. Probiotic *Lactobacillus reuteri* biofilms produce antimicrobial and anti-inflammatory factors. *BMC Microbiology*, 2009, Vol. 9, p. 35.
24. Khokhlova E.V., Smeianov V.V., Efimov B.A., Kafarskaia L.I., Pavlova S.I. Anti-inflammatory properties of intestinal *Bifidobacterium* strains isolated from healthy infants. *Microbiol. Immunol.*, 2012, Vol. 56, no. 1, pp. 27-39.
25. Kole A., Maloy K.J. Control of intestinal inflammation by interleukin-10. *Curr Top Microbiol Immunol.*, 2014, Vol. 380, pp. 19-38.
26. Lan J.-G., Cruickshank S.M., Singh J.C.I., Farrar M., Lodge J.P.A., Felsburg P.J., Carding S.R. Different cytokine response of primary colonic epithelial cells to commensal bacteria. *World Gastroenterol.*, 2005, Vol. 11, no. 22, pp. 3375-3384.
27. Maassen C., Claassen E. Strain-dependent effects of probiotic lactobacilli on EAE autoimmunity. *Vaccine*, 2008, Vol. 26, no. 17, pp. 2056-2057.
28. Medina M., Izquierdo E., Ennahar S., Sanz Y. Differential immunomodulatory properties of *Bifidobacterium longum* strains: relevance to probiotic selection and clinical applications. *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, Vol. 150, no 3, pp. 531-538.
29. Miquel S., Martín R., Rossi O., Bermúdez-Humarán L., Chatel J., Sokol H., Thomas M., Wells J., Langella P. Faecalibacterium *prausnitzii* and human intestinal health. *Curr. Opin. Microbiol.*, 2013, Vol. 16, no. 3, pp. 255-261.
30. Ouwehand A.C., Salminen S., Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2002, Vol. 82, pp. 279-289.
31. Pagnini C., Saeed R., Bamias G., Arseneau K.O., Pizarro T.T., Cominelli F. Probiotics promote gut health through stimulation of epithelial innate immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2010, Vol. 107, no. 1, pp. 454-459.
32. Qiu X., Zhang M., Yang X., Hong N., Yu C. Faecalibacterium *prausnitzii* upregulates regulatory T cells and anti-inflammatory cytokines in treating TNBS-induced colitis. *J. Crohns. Colitis.*, 2013, Vol. 7, pp. 558-568.
33. Saleh M., Elson C.O. Experimental inflammatory bowel disease: insights into the host-microbiota dialog. *Immunity*, 2011, Vol. 34, no. 3, pp. 293-302.
34. Sartor R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn's disease and ulcerative colitis. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, 2006, Vol. 3, pp. 390-407.
35. Silva V. de O., Foureaux R.C., Araujo T.S., Peconick A.P., Zangeronimo M.G., Pereira L.J. Effect of Probiotic Administration on the Immune Response. A Systematic Review of Experimental Models in Rats. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 2012, Vol. 55, no. 5, pp. 685-694.
36. Suvorov A. Gut Microbiota, Probiotics, and Human Health. *Bioscience of Microbiota, Food and Health*, 2013, Vol. 32, no. 3, pp. 81-91.
37. Wang S., Mei Ng L.H., Chow W.L., Lee Y.K. Infant intestinal *Enterococcus faecalis* down-regulates inflammatory responses in human intestinal cell lines. *World J. Gastroenterology*, 2008, Vol. 14, no. 7, pp. 1067-1076.

38. Xu X.R., Liu C.Q., Feng B.S., Liu Z.J. Dysregulation of mucosal immune response in pathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 12, pp. 3255-3264.
39. Young V.B. The intestinal microbiota in health and disease. *Opin. Gastroenterol*, 2012, Vol. 28, pp. 63-69.
40. Zhi-bing Q., Liang Z., Chen J., Lan R., Jian C. Construction of a recombinant *Lactobacillus* strain expressing IL-10. *Infect. Immun.*, 2004, Vol. 72, no. 9, pp. 5308-5314.
41. Zhipeng L., Guangyu L., Hanlu L., Jiaping Z., Yi J., Fuhe Y. The analysis of the impacting factors of probiotics on immune responses. *African Journal of Microbiology Research*, 2012, Vol. 6, no. 11, pp. 2735-2743.
42. Zughailer S.M., Zimmer S.M., Datta, A., Carlson, R.W., Stephens D.S. Differential induction of the toll-like receptor 4-MyD88-dependent and -independent signaling pathways by endotoxins. *Infect. Immun*, 2005, Vol. 73, pp. 2940-2950.

Авторы:

Аверина О.В. — д.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория генетики микроорганизмов ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

Ермоленко Е.И. — д.м.н., заведующий лабораторией биомедицинской микроэкологии, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; профессор кафедры физиологии, медицинский факультета, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Тарасова Е.А. — научный сотрудник, отдел нормальной физиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ратушный А.Ю. — студент 5 курса МГУ, ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

Борщев Ю.Ю. — к.б.н., научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Леонтьева Г.Ф. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Крамская Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Котылева М.П. — научный сотрудник, отдел молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Даниленко В.Н. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией генетики микроорганизмов, ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» Российской академии наук, Москва, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинской технологии, ФГБУН «Институт экспериментальной медицины»; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Averina O.V., PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Genetics of Microorganisms, N.I. Vavilov Research Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Ermolenko E.I., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Biomedical Microecology, Research Institute of Experimental Medicine; Professor, Faculty of Medicine, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Tarasova E.A., Research Associate, Department of Normal Physiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Ratushniy A. Yu., Student Moscow State University, Research Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Borshev Yu. Yu., PhD (Biology), Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Leontieva G.F., PhD (Biology), Leading Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kramskaya T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kotyleva M.P., Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Danilenko V.N., PhD, MD (Biology), Professor, Chief, Laboratory of Genetics of Microorganisms, Research Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief of Department of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine; head of the Department of Fundamental medicine and medical technologies in Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 25.03.2015

Отправлена на доработку 29.04.2015

Принята к печати 06.07.2015

Received 25.03.2015

Revision received 29.04.2015

Accepted 06.07.2015

МЕХАНИЗМЫ АКТИВАЦИИ КИШЕЧНО- АССОЦИИРОВАННОЙ ЛИМФОИДНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СОЦИАЛЬНОГО СТРЕССА

Камышный А.М., Топол И.А.

Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Резюме. Стресс-индуцированная иммунная дисрегуляция является фактором риска развития аутоиммунных и воспалительных заболеваний, однако механизмы такого влияния на сегодняшний момент в полной мере не известны.

Мы изучили уровень экспрессии мРНК NR3C1- и Adrβ2-рецепторов, провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-17α, Nlrp3-субъединицы инфламмосомы, а также выявили особенности распределения RORγt⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ лимфоцитов в КАЛТ крыс в условиях ХСС.

Эксперимент проводили на самках крыс линии Вистар в возрасте 5-6 месяцев. Для определения уровня экспрессии мРНК генов-мишеней проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США). Относительный уровень экспрессии вышеуказанных генов оценивали по методу ΔΔCt, нормализуя по референс-гену GAPDH. Иммунопозитивные лимфоциты были идентифицированы с помощью метода непрямой иммунофлуоресценции с использованием моноклональных антител.

Развитие ХСС приводит к снижению уровня экспрессии мРНК Nr3c1 и Adrβ2-рецепторов в клетках КАЛТ и сопровождается однонаправленной динамикой по увеличению транскрипционной активности генов провоспалительных цитокинов IL-1β, IL-17α и Nlrp3-инфламмосомы. Данные изменения сопровождаются снижением соотношения FoxP3⁺/RORγt⁺ клеток, свидетельствуя о доминировании Th17-дифференцировки на фоне супрессорной недостаточности. Развитие ХСС сопровождалось однонаправленной тенденцией по увеличению общего количества LMP2⁺ лимфоцитов и снижению плотности популяции XBP1⁺ клеток в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс.

События, происходящие в КАЛТ в условиях ХСС, противоречат классической парадигме стресса и провоцируют не иммуносупрессию, а выраженную активацию иммунной системы и воспалительный процесс.

Ключевые слова: хронический социальный стресс, Nr3c1, Adrβ2, IL-1β, IL-17α, Nlrp3

ACTIVATION MECHANISMS OF GUT-ASSOCIATED LYMPHOID TISSUE UNDER CHRONIC SOCIAL STRESS CONDITIONS

Kamyshnyi A.M., Topol I.A.

Zaporozh'ye State Medical University, Zaporozh'ye, Ukraine

Abstract. Stress-induced immune dysregulation is a risk factor of autoimmune and inflammatory diseases, but, so far, the mechanisms for this effect are not fully known. Expression levels of specific mRNAs were assessed

Адрес для переписки:

*Камышный Александр Михайлович
Запорожский государственный медицинский университет
69035, Украина, г. Запорожье, пр. Маяковского, 26.
Тел.: +38 (061) 234-26-31.
E-mail: alexkamyshny@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Kamyshnyi Alexandr M.
Zaporozh'ye State Medical University,
69035, Ukraine, Zaporozh'ye, Mayakovsky ave, 26.
Phone: +38 (061) 234-26-31.
E-mail: alexkamyshny@yandex.ru*

Образец цитирования:

*А.М. Камышный, И.А. Топол, «Механизмы активации
кишечно-ассоциированной лимфоидной ткани в условиях
хронического социального стресса» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 455-460.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-455-460*

For citation:

*A.M. Kamyshnyi, I.A. Topol, "Activation mechanisms of gut-
associated lymphoid tissue under chronic social stress conditions",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2015, Vol. 17, no. 5, pp. 455-460.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-455-460*

© Камышный А.М., Топол И.А., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-455-460>

in gut-associated lymphoid tissue (GALT) from Wistar rats subjected to chronic social stress (CSS). Gene expression was evaluated for NR3C1, Adr β 2, as well as IL-1 β , IL-17 α pro-inflammatory cytokines, and *Nlrp*, an inflammasome gene. Under the CSS conditions, we have shown altered distribution of ROR γ t⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ lymphocytes in GALT.

The experiments were carried out with female Wistar rats aged 5–6 months. Specific mRNA expression for the target genes was determined by means of real-time PCR performed in a CFX96™ thermocycler («Bio-Rad Laboratories, Inc», USA). Relative levels of a target gene expression were quantified by the $\Delta\Delta$ Ct method, being compared with rat GAPDH reference gene expression. Statistical analysis was performed with available «Bio-Rad CFX Manager 3.1» software. Specific monoclonal rat antibodies were used for detection of immunopositive lymphocytes by means of indirect immunofluorescence technique.

CSS development leads to decreased levels of mRNA expression for *Nr3c1* and *Adr β 2*-genes in the GALT cells, being accompanied with unidirectional changes, i.e., increased transcription of pro-inflammatory cytokine mRNAs (IL-1 β , IL-17 α) and *Nlrp3*-inflammasome genes. These changes are accompanied by decreased FoxP3⁺/ROR γ t⁺ cell ratio and predominant Th17 differentiation accompanied by suppressor failure. In addition, CSS development was characterized by unidirectional tendency for increasing total number of LMP2⁺ lymphocytes and reduced XBP1⁺ cell population density in lymphoid structures of rat ileum.

The events observed in GALT cell populations under CSS conditions are opposing classical paradigm of the stress response. The CSS-associated effects do not promote immunosuppression, however, are able to cause activation of immune system and inflammatory process.

Keywords: chronic social stress, lymphoid tissue, gut-associated, gene expression, Nr3c1, Adr β 2, IL-1 β , IL-17 α , Nlrp3

Введение

Стресс-индуцированная иммунная дисрегуляция приводит к значительным негативным последствиям для здоровья, увеличивая риск развития аутоиммунных и воспалительных заболеваний, включая сахарный диабет 1 типа (СД 1 типа) и воспалительные заболевания кишечника (ВЗК) [9]. Главными эффекторными гормонами во время стресс-реакции являются глюкокортикоиды (ГК) и катехоламины (КХ), а изменения уровня экспрессии их рецепторов *Nr3c1* и *Adr β 2* могут приводить к резистентности к ГК и КХ и объяснить преобладание провоспалительной сигнализации в условиях хронического социального стресса (ХСС) [10, 14]. Известно, что иммунокомпетентные клетки имеют рецепторы к ГК и КХ, и благодаря этому обстоятельству возможно прямое влияние этих гормонов на функциональные элементы как врожденного, так и адаптивного иммунитета и их участие в регуляции иммунного ответа в условиях ХСС [11, 14].

В наших предыдущих работах было установлено, что развитие ХСС сопровождается увеличением количества TLR2⁺ и TLR4⁺ лимфоцитов в КАЛТ, изменяет баланс TLR2⁺/TLR4⁺ клеток, усиливает экспрессию *Nf- κ B*, что закономерно должно активировать продукцию провоспалительных цитокинов в этом регионе [16]. Для подтверждения этой гипотезы мы выяснили в данном исследовании уровень экспрессии в КАЛТ мРНК наиболее «агрессивных» цитокинов IL-1 β и IL-17 α , а также *Nlrp3*-инфламماسомы. *Nlrp3* ответственна за активацию каспазы-1 и способствует созреванию IL-1 β , а ее увеличенная экспрессия связана с развитием многих ауто-

иммунных и воспалительных заболеваний [12]. Интригуют также данные о способности глюкокортикоидов в условиях стресса активировать образование *Nlrp3*-инфламماسомы [4].

Кроме того, тонкий кишечник является одним из основных мест генерации индуцибельных Treg – клеток (iTreg) [1] и резервуаром пула Th17-клеток [8], так как именно здесь происходит индукция их дифференцировки из наивных Т-лимфоцитов с участием кишечной микрофлоры. Не менее важную роль в функционировании адаптивного звена иммунитета в условиях ХСС играют иммунные протеасомы и система ответа на несвернутые белки (unfolded protein response – UPR) [2]. В частности, иммунная протеасома LMP2 принимает участие в образовании антигенных эпитопов из собственных и чужеродных белков, их презентации вместе с молекулами МНС I-II классов Т-лимфоцитам, а транскрипционный фактор XBP1 является одним из ключевых участников UPR при стрессе эндоплазматического ретикулаума (СЭР) [5].

Цель исследования – изучить уровень экспрессии мРНК *NR3C1* и *Adr β 2*, провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-17 α , *Nlrp3*-субъединицы инфламماسомы, а также выявить особенности распределения ROR γ t⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ лимфоцитов в КАЛТ крыс в условиях ХСС.

Материалы и методы

Исследования проводились на 60 самках крыс линии Wistar, которые были разделены на три экспериментальные группы: контрольные крысы (группа 1); крысы, которым моделировали ХСС1 путем трехнедельной социальной изоля-

ции и длительного психоэмоционального воздействия (ПЭВ) (группа 2); крысы, которым моделировали ХСС2 путем содержания животных в перенаселенных клетках (20 крыс на клетку) в течение 3 недель с ежедневной сменой группировки, при котором подопытную самку каждый день помещали в новую сбалансированную и перенаселенную колонию (группа 3).

Объектом для молекулярно-генетических исследований у экспериментальных животных были сгруппированные лимфоидные узелки подвздошной кишки. РНК получали из гистологических срезов толщиной 15 мкм, для этого проводили их депарафинизацию в ксилоле и регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора «Trizol RNA Prep 100» (Изоген Lab., LTD, Россия). Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор ОТ-1 фирмы «Синтол» (Россия). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H₂O, очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Для определения уровня экспрессии исследуемых генов использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems («Bio-Rad Laboratories, Inc.», США) и набор реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Специфические пары праймеров для анализа исследуемых и референтного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой Metabion (Германия). После начальной денатурации в течение 10 мин при 95 °С амплификация состояла из 45-50 циклов и проводилась при следующих условиях: денатурация – 95 °С, 15 сек., отжиг – 59-61 °С, 30-60 сек., элонгация – 72 °С, 30 сек. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследуемых генов был использован ген глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH). Относительное нормализованное количество кДНК целевых генов определяли методом ΔΔC_t. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США).

Структуру популяции RORγ⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ клеток изучали на основании анализа серийных гистологических срезов и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы подвздошной кишки.

Данные срезы депарафинировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1М фосфатном буфере (pH = 7,4) и окрашивали с первичными моноклональными антителами (МКАТ) к соответствующим антигенам крысы (SantaCruzBiotechnology, США) в течение 18 часов во влажной камере при T = 4 °С. После отмывания избытка первичных антител в 0,1М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут (T = 37 °С) с вторичными антителами (SantaCruzBiotechnology, США), конъюгированными с FITC. После инкубации срезы промывали 0,1М фосфатным буфером и заключали в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:9) для последующей люминесцентной микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы ImageJ (НИН, США). Изображение, получаемое на микроскопе PrimoStar (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) с помощью высокочувствительной камеры AxioCam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображений к публикации AxioVision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводилось в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флюоресценцией, характерной для клеток, экспрессирующих RORγ⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺ и XBP1⁺. Рассчитывались морфометрические и денситометрические характеристики иммунопозитивных клеток. При окраске МКАТ исследовали RORγ⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺ и XBP1⁺ лимфоциты, расположенные в собственной пластинке слизистой оболочки заполненных лимфоцитами ворсинок (Lymphocyte-filled villi, LFV, ЗЛВ), являющиеся отдельным компартментом КАЛТ у крыс и в субэпителиальной зоне сгруппированных лимфоидных узелков (СЭЗ, PPSub). Все полученные экспериментальные данные обрабатывали на персональном компьютере пакетом прикладных и статистических программ EXCEL из пакета MS Office 2010 (MicrosoftCorp.США), STATISTICA 6.0 (Stat-Soft, 2001).

Результаты

На первом этапе работе для подтверждения нашей гипотезы о том, что в условиях ХСС наблюдается активация иммунной системы и усиление провоспалительной сигнализации в КАЛТ вопреки классической парадигме стресса, мы изучили уровень экспрессии мРНК NR3C1 и Adrβ2, цитокинов IL-1β, IL-17α, Nlrp3-субъединицы инфламмосомы. Исследование экспрессии Nr3c1 и Adrβ2 в КАЛТ подвздошной кишки показало, что развитие ХСС приводило к значительному

снижению содержания мРНК исследуемых генов (Nr3c1 – в 3,1 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 и в 10 раз ($p < 0,01$) на фоне ХСС2 (рис.1А); Adrβ2 – в 12,5 раз ($p < 0,02$) при ХСС1 и в 10,1 раз ($p < 0,01$) в случае ХСС2 по сравнению с контрольной группой крыс (рис. 1Б). Кроме того, в нашем исследовании было выявлено, что ХСС сопровождается транскрипционной индукцией генов провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-17α, а также Nlrp3-инфламмосомы в КАЛТ крыс, более выраженной в случае ХСС1. В частности, проведенное исследование показало одностороннюю динамику роста транскрипционной активности генов Nlrp3-инфламмосомы (в 17 раз ($p < 0,05$) при ХСС1 и в 2,2 раза ($p < 0,05$) при ХСС2, рис.1В); IL-1β (в 6 раз ($p < 0,05$) при ХСС1 и в 2,8 раз ($p < 0,05$) при ХСС2, рис.1Г); IL-17α (в 2,3 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 и на 50% ($p < 0,05$) при ХСС2 по сравнению с контрольной группой животных.

На втором этапе исследования мы выяснили особенности распределения RORγt⁺, FoxP3⁺, LMP2⁺, XBP1⁺ лимфоцитов в КАЛТ крыс в условиях ХСС. Нами установлено, что развитие ХСС приводило к увеличению количества RORγt⁺ лимфоцитов (на 94% – в 2,1 раза в ЗЛВ, в 2,3 раза в СЭЗ только в случае ХСС2) по сравнению с контролем и сопровождалось ростом концентрации RORγt. Эти изменения происходили на фоне уменьшения количества FoxP3⁺ лимфоцитов (на 44-49% в ЗЛВ, 20-39% в СЭЗ) и свидетельствовали о доминировании в условиях ХСС Th17-дифференцировки и повышении уровня провоспалительной сигнализации в кишечнике. При этом коэффициент распределения FoxP3⁺/RORγt⁺ клеток уменьшился в ЗЛВ в 4,1 раза ($p < 0,05$) в случае ХСС1 и в 3,5 раза ($p < 0,05$) при ХСС2; в СЭЗ – на 39% ($p < 0,05$) при ХСС1 и в 3,8 раза ($p < 0,05$) в случае ХСС2, по сравнению с контролем.

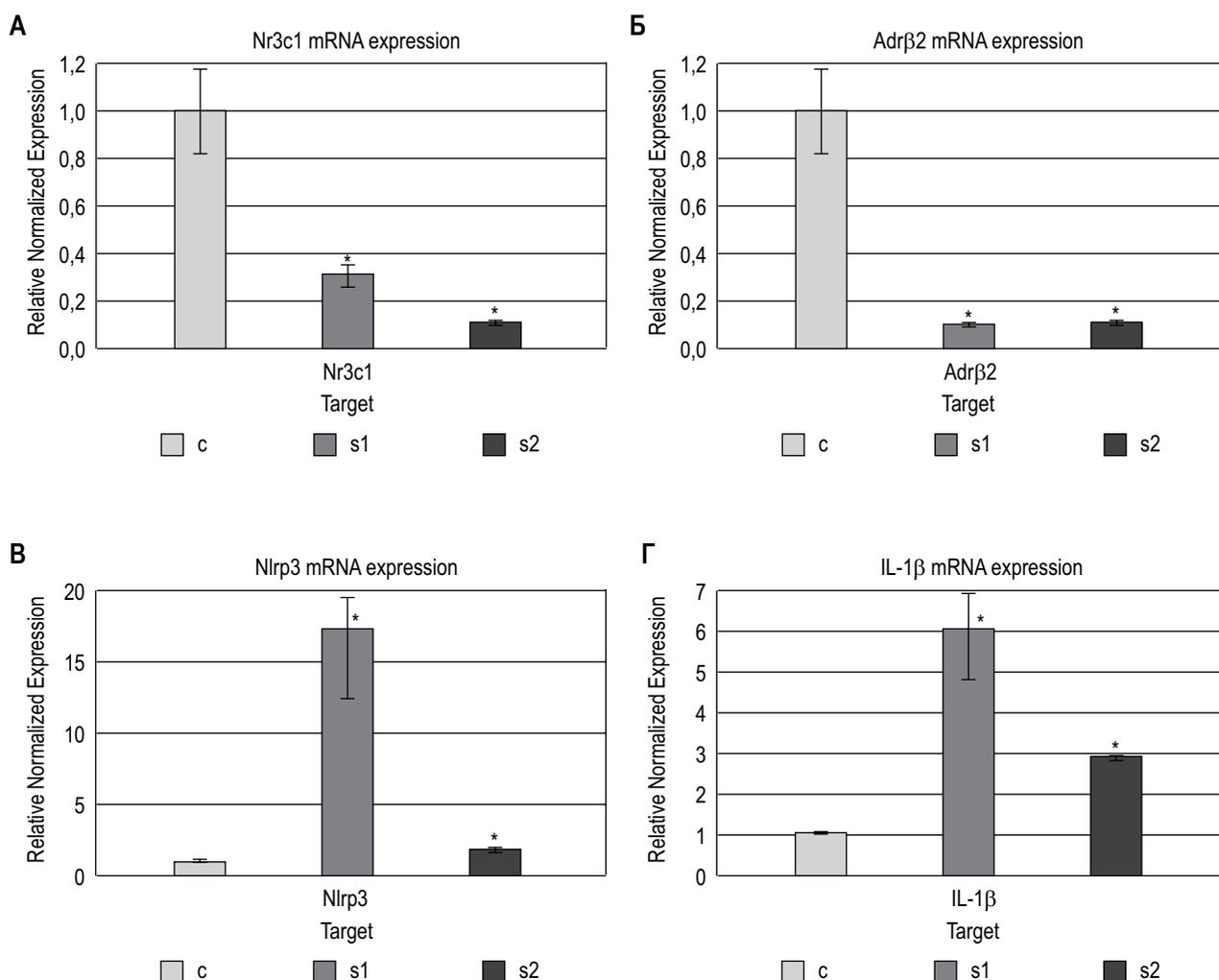


Рисунок 1. Относительное нормализованное количество мРНК гена глюкокортикоидных рецепторов Nr3c1 (А), β2-адренергического рецептора Adrβ2 (Б), Nlrp3-субъединицы инфламмосомы (В), IL-1β (Г) в клетках КАЛТ. Нормализация по методу ΔΔCt с референс-геном GAPDH. с-контроль; s1-ХСС1; s2-ХСС2

Нами установлено, что развитие ХСС сопровождалось однонаправленной тенденцией к увеличению общего количества LMP2⁺ лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс, наиболее выраженной в ЗЛВ, а изменение концентрации LMP2 в иммунных клетках зависело от вида стресса. Так, суммарная плотность LMP2⁺ клеток в ЗЛВ выросла в 3,2 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 и в 2,5 раза ($p < 0,05$) при ХСС2; в СЭЗ – в 2,6 раза ($p < 0,05$) при ХСС1 и на 46% ($p < 0,05$) на фоне ХСС2. Развитие ХСС сопровождалось однонаправленной тенденцией к снижению общего количества ХВР1⁺ лимфоцитов в ЗЛВ на 31% (ХСС1) – 35% (ХСС2) ($p < 0,05$), в СЭЗ – на 47% (ХСС2) – 58% (ХСС1) ($p < 0,05$) по сравнению с контролем.

Обсуждение

Полученные нами данные подтверждаются целым рядом других исследований. Так, применение различных экспериментальных моделей ХСС показало, что он может вызвать генерацию и выход незрелых, провоспалительных миелоидных клеток, которые являются нечувствительными к эффектам глюкокортикоидов. Так, Jung S. et al., (2015) установили, что экспрессия мРНК ГК рецепторов была значительно уменьшена в макрофагах селезенки при ХСС [10]. Sanders V. et al. (2012) было установлено, что активация β 2AR нарушает дифференцировку, пролиферацию и функции Th1-клеток в результате повышения концентрации цАМФ в лимфоцитах, что приводит к ингибированию пролиферации Т-клеток и снижению продукции провоспалительных IL-2, IL-12, TNF α и IFN γ и стимулирует выработку противовоспалительных IL-10 и TGF- β [14]. В исследованиях Guerreschi M.G. et al. (2013) было обнаружено, что передача сигналов через β 2AR усиливала супрессорную активность Treg *in vitro*, способствовала конверсии FoxP3⁺ клеток в FoxP3⁺ индуцибельные iTreg клетки [6]. Кроме того, в Treg-клетках β 2AR сигнализация увеличивала экспрессию негативной ко-стимуляторной молекулы CTLA-4 [6]. Поэтому обнаруженное нами в работе снижение уровня экспрессии мРНК β 2AR может частично объяснить причину дефицита супрессорной сигнализации, помимо резистентности к ГК.

Выявленная нами транскрипционная индукция генов провоспалительных цитокинов IL-1 β и IL-17 α , а также Nlrp3-инфламмосомы соответствует целому ряду клинических наблюдений,

показавших, что ХСС самой различной природы, включая социальную изоляцию, потерю близких родственников, низкий социально-экономический статус, угрожающий жизни диагноз и другое увеличивает экспрессию провоспалительных генов в иммунных клетках (например, IL1 β , IL6, IL8, IL17A, TNF α) и уменьшает экспрессию генов, вовлеченных во врожденные противовирусные ответы (IFNB, IFIs, MX, OAS) [13]. Усиление экспрессии мРНК NLRP3 было показано и при воспалении тонкого кишечника, а также на моделях колита [3], а в исследовании Meng et al. (2010) при анализе CD4⁺T-клеточного ответа у мышей в результате гиперактивации NLRP3 наблюдалось явное смещение баланса Th1/Th17 в сторону Th17-ответа [12].

Полученные нами результаты совпадают с данными Hong M. (2013), которые демонстрируют, что при развитии стресса и стресс-индуцированной депрессии в лимфоидных органах у мышей изменяется количество Th17-лимфоцитов и нарушается баланс между Treg/Th17-клетками [7]. Это подтверждается и обнаруженной нами общей тенденцией к достоверному снижению соотношения Treg/Th17-лимфоцитов в лимфоидных структурах подвздошной кишки крыс.

Повышенная экспрессия LMP2 может способствовать развитию воспалительных и аутоиммунных заболеваний, в частности СД1 типа, ревматоидного артрита, неспецифического язвенного колита, болезни Крона, воспалительных заболеваний кишечника [17]. Кроме того, иммунные протеасомы напрямую влияют на дифференцировку, выживание и пролиферацию Т-лимфоцитов, а их ингибирование приводит к уменьшению экспансии Th1- и Th17-клеток и способствует развитию Treg при экспериментальном колите. В свою очередь, выявленные нами изменения экспрессии Xbp1 могут индуцировать развитие воспалительных и АИЗ [5], а ХВР1-дефицитные В-лимфоциты демонстрируют нарушенную дифференцировку в плазмочиты и изменения продукции антител [15].

Таким образом события, происходящие в КАЛТ в условиях ХСС явно противоречат классической парадигме стресса и провоцируют не иммуносупрессию, а выраженную активацию иммунной системы и воспалительный процесс. Данные изменения, на наш взгляд, могут быть одними из триггеров развития ВЗК.

Список литературы / References

1. Angelina M., Lafaille J.B., Lafaille J.J. Induced CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in Immune Tolerance. *Annu. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 30, pp. 733-758.
2. Basler M., Kirk C., Groettrup M. The immunoproteasome in antigen processing and other immunological functions. *Curr. Opin. Immunol.*, 2013, Vol. 1, pp. 74-80.

3. Dupaul-Chicoine J., Yeretssian G., Doiron K. Control of intestinal homeostasis, colitis, and colitis-associated colorectal cancer by the inflammatory caspases. *Immunity*, 2010, Vol. 32, pp. 367-378.
4. Frank M.G., Hershtman S.A., Weber M.D. Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus. *Psychoneuroendocrinology*, 2014, Vol. 40, pp. 191-200.
5. Glimcher L. XBP1: the last two decades. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, pp. 67-71.
6. Guerreschi M.G., Araujo L.P., Maricato J.T. Beta2-adrenergic receptor signaling in CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cells enhances their suppressive function in a PKA-dependent manner. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 4, pp. 1001-1012.
7. Hong M. Imbalance between Th17 and T-reg cells may play an important role in the development of chronic unpredictable mild stress-induced depression in mice. *Neuroimmunomodulation*, 2013, Vol. 20, no. 1, pp. 39-50.
8. Huber S., Gagliani N., Flavell R. Life, death, and miracles: Th17 cells in the intestine. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, pp. 2238-2245.
9. Iglesias-Rey M., Barreiro-de Acosta M., Caamaño-Isorna F. Psychological factors are associated with changes in the health-related quality of life in inflammatory bowel disease. *Inflamm. Bowel. Dis.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 92-102.
10. Jung S., Wang Y., Kim T. Molecular mechanisms of repeated social defeat-induced glucocorticoid resistance: Role of microRNA. *Brain Behav. Immun.*, 2015, Vol. 44, pp. 195-206.
11. Meijsing S.H., Pufall M.A., So A.Y. DNA Binding Site Sequence Directs Glucocorticoid Receptor Structure and Activity. *Science*, 2009, Vol. 324, no. 5925, pp. 407-410.
12. Meng G., Strober W. New insights into the nature of autoinflammatory diseases from mice with Nlrp3 mutations. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, pp. 649-653.
13. Powell D., Sloan K., Bailey M. Social stress sup-regulates inflammatory gene expression in the leukocyte transcriptome α -adrenergic induction of myelopoiesis. *PNAS*, 2013, Vol. 3, pp. 1-6.
14. Sanders M. The Beta2-Adrenergic Receptor on T and B Lymphocytes: Do We Understand It Yet? *Brain Behav. Immun.*, 2012, Vol. 26, no. 2, pp. 195-200.
15. Todd D., Lee A., Glimcher L. The endoplasmic reticulum stress response in immunity and autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 9, pp. 663-674.
16. Topol I., Kamyshnyi A. Study of expression of TLR2, TLR4 and transcription factor NF- κ B structures of GALT of rats in the conditions of the chronic social stress and modulation of structure of intestinal microflora. *Georgian Medical News*, 2013, Vol. 12, no. 225, pp. 115-122.
17. Visekruna A., Slavova N., Dullat S., Grone J., Kroesen A., Ritz J., Buhr H., Steinhoff U. Expression of catalytic proteasome subunits in the gut of patients with Crohn's disease. *Int. J. Colorect. Dis.*, 2009, Vol. 10, pp. 1133-1139.

Авторы:

Камышный А.М. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Топол И.А. — ассистент кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Authors:

Kamyshnyi A.M., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Chief, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Topol I.A., Assistant Professor, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Поступила 17.06.2015

Отправлена на доработку 30.06.2015

Принята к печати 01.07.2015

Received 17.06.2015

Revision received 30.06.2015

Accepted 01.07.2015

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ

**Балацкая Н.В., Еремеева Е.А., Слепова О.С., Рябина М.В.,
Куликова И.Г., Сорожкина Е.С.**

*ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства
здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Резюме. В статье представлены результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови у пациентов с ранними стадиями возрастной макулярной дегенерации, здоровых людей пожилого возраста без офтальмопатологии (группа риска ВМД) в сравнении со здоровыми молодыми людьми (контролем). Выявлено повышение абсолютного и относительного (процентного) количества цитотоксических ($CD3^+CD8^+$) и дубль-позитивных Т-клеток ($CD3^+CD4^+CD8^+$), В-лимфоцитов ($CD19^+$), увеличение частоты их повышенного содержания в крови у пациентов с начальной и промежуточной стадиями ВМД и здоровых лиц старшего возраста в сравнении с «молодым» контролем, что позволяет думать о возможной роли сдвигов в содержании данных субпопуляций лимфоцитов в патогенезе ВМД.

Ключевые слова: лимфоциты, субпопуляции, кровь, возрастная макулярная дегенерация

PERIPHERAL BLOOD SUBPOPULATION OF LYMPHOCYTES OF PATIENTS WITH AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

**Balatskaya N.V., Ereemeeva E.A., Slepova O.S., Ryabina M.V.,
Kulikova I.G., Sorozhkina E.S.**

The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. The article presents results of studies concerning subpopulations of peripheral blood lymphocyte in the patients at early stages of age-related macular degeneration (AMD), being compared with healthy elderly persons (risk group for AMD), and young adults without ophthalmological problems.

We have revealed an increase in absolute counts and percentages of the cytotoxic cells ($CD3^+CD8^+$), and double-positive T cell subpopulations ($CD3^+CD4^+CD8^+$), like as of B-lymphocyte contents, higher frequency of their increased content in peripheral blood of the patients with early and intermediate stages of AMD and healthy older people, as compared with young controls, thus allowing to suggest a potential role of these shifts in lymphocyte subpopulations for the AMD pathogenesis.

Keywords: lymphocytes, subpopulation profile, blood, macular degeneration, age-related

Адрес для переписки:

*Балацкая Наталья Владимировна
ФГБУ «Московский НИИ глазных болезней им.
Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва, ул. Садовая-Черногрязская,
14/19.
Тел.: 8 (916) 976-61-27.
E-mail: balnat07@rambler.ru*

Address for correspondence:

*Balatskaya Natalia V.
The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (916) 976-61-27.
E-mail: balnat07@rambler.ru*

Образец цитирования:

*Н.В. Балацкая, Е.А. Еремеева, О.С. Слепова, М.В. Рябина,
И.Г. Куликова, Е.С. Сорожкина, «Субпопуляционный
состав лимфоцитов периферической крови у пациентов
с возрастной макулярной дегенерацией» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 461-466.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-461-466*

For citation:

*N.V. Balatskaya, E.A. Ereemeeva, O.S. Slepova, M.V. Ryabina,
I.G. Kulikova, E.S. Sorozhkina, "Peripheral blood subpopulation
of lymphocytes of patients with age-related macular degeneration",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2015, Vol. 17, no. 5, pp. 461-466.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-461-466*

© Балацкая Н.В. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-461-466>

Введение

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) — хроническое, необратимое, прогрессирующее поражение центрального отдела сетчатки, является одной из главных причин слепоты в пожилом возрасте [2]. Доказательства прямой зависимости частоты заболевания от возраста позволяют говорить об инволюционном характере заболевания и рассматривать возраст как серьезный фактор риска [1]. Несмотря на многочисленные исследования, патогенез ВМД во многом не расшифрован. Имеются свидетельства (в основном экспериментальные) важной роли иммунологических факторов в возникновении и развитии заболевания [9, 10, 15]. Показано, что в процессе старения ретинальный пигментный эпителий (РПЭ) видоизменяется: между РПЭ и мембраной Бруха появляются внеклеточные образования — друзы, многочисленность и слияние которых повышают риск развития терминальных стадий ВМД. Благодаря друзам, содержащим амилоид Р, фрагменты комплемента, пигментный эпителий сетчатки приобретает иммуногенные свойства и становится эпицентром хронического локального воспаления. Прогрессирование заболевания ассоциируется с локальной ишемией клеток пигментного эпителия и активацией РПЭ, накоплением тканеспецифических аутоантител; у большинства больных с ВМД аутоантитела выявляются и в сыворотке крови [6]. Переход в развитую, влажную форму ВМД, характеризующуюся хориоидальной неоваскуляризацией — ростом неполноценных сосудов с повышенной проницаемостью стенки в субретинальное пространство, связывается со стремительным нарастанием ишемии, усилением выработки проангиогенных стимулов, например, VEGF (фактора роста эндотелия сосудов, а также фактора, усиливающего проницаемость сосудов), срывом защитных механизмов — ослаблением продукции антиангиогенных факторов клетками РПЭ, в частности PEDF (пигментный эпителий зависимого фактора). Влажная форма ВМД является поздней стадией и требует особенных подходов к лечению (выполнения интравитреальных инъекций анти-VEGF препаратов).

В связи с этим представляется важным определение критериев раннего прогнозирования и разработки подходов к профилактике и лечению ВМД, что определяет актуальность сравнительного исследования лабораторных показателей на разных стадиях заболевания, включая группы риска.

В литературе высказываются предположения, что одним из иммунологических механизмов, способствующих развитию и прогрессированию ВМД, являются нарушения в субпопуляцион-

ном составе лимфоцитов периферической крови [3, 4]. Однако целенаправленные исследования этого вопроса в эксперименте не проводились, а в клинике единичны. Особенности субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови на разных стадиях заболевания и в группах риска остаются до настоящего времени малоизученными, рассматривались они в основном на развитых или далеко зашедших стадиях ВМД [3].

Цель: исследование субпопуляционного состава лимфоцитов у больных ВМД различной степени тяжести в сравнении со здоровыми лицами пожилого (риск ВМД) и молодого возраста.

Материалы и методы

Всего в исследование было включено 47 человек. Первую группу составили 18 здоровых лиц молодого возраста (средний возраст $27,7 \pm 4,03$ лет; контрольная группа). В остальные группы, сформированные согласно клинической классификации ВМД (AREDS) [7], вошли 29 человек: 11 практически здоровых доноров пожилого возраста без признаков офтальмопатологии вошли во вторую группу (AREDS1; группа риска ВМД; средний возраст $57,1 \pm 11,8$ лет), в третью группу — 9 пациентов с начальной стадией ВМД (AREDS2; возраст $53,2 \pm 11,5$ года), и четвертую группу составили 9 больных с промежуточной стадией ВМД (AREDS3; средний возраст $57,1 \pm 11,8$ лет). Материалом исследования служили пробы цельной крови, взятой из локтевой вены натощак в утренние часы (с 9^{00} до 10^{00} ч) при помощи вакуумных систем в пробирки Vacuette® с антикоагулянтом K_3EDTA . Иммунофенотипирование проводили методом лазерной проточной цитофлуориметрии на цитометре BD FACSCanto II (Becton Dickinson, США) с использованием системы моноклональных антител Multitest 6-Color TBNK Reagent в пробирках BD TruCount (Becton Dickinson, США). Для лизиса эритроцитов и фиксации лейкоцитов использовали лизирующий раствор BD FACS™ Lysing Solution (Becton Dickinson, США). Относительное и абсолютное содержание популяций и субпопуляций лимфоцитов определялось в программе Canto (Becton Dickinson, США), с выделением анализируемого региона по общей популяции, экспрессирующей CD45⁺ антиген, и по гранулярности клеток (CD45⁺PerCP-Cy5,5*/SSC); использовались меченные флуорохромами антитела к CD3⁺(FITC), CD4⁺(PE-Cy7*), CD8⁺ (APC-Cy7*), CD16⁺/56⁺(PE), CD19⁺(APC*), позволяющие дифференцировать клетки: Т-лимфоциты (CD3⁺), Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺CD8⁻), Т-цитотоксические (CD3⁺CD4⁻CD8⁺), Т-дубль позитивные (CD3⁺CD4⁺CD8⁺), NK-клетки — нату-

ральные киллеры (CD16⁺CD56⁺), В-лимфоциты (CD19⁺), вычислить соотношение субпопуляций CD3⁺CD4⁺/CD3⁺CD8⁺ – иммунорегуляторный индекс (ИРИ), отражающий баланс Т-хелперов и цитотоксических Т-клеток (CD4⁺/CD8⁺).

Статистическая обработка данных проведена с помощью программного комплекса Professional BioStat для Windows Version 2009 (M – среднее, Σ – среднее квадратическое отклонение; t – критерий Стьюдента, критерии Фишера и χ²), уровень статистической значимости: p < 0,05.

Результаты и обсуждение

Результаты исследования субпопуляционного состава лимфоцитов крови больных ВМД, лиц пожилого возраста (группа риска развития ВМД) в сравнении с молодым контролем представлены в таблице 1.

Сравнение результатов исследования двух групп людей (молодых и пожилых) без явных признаков офтальмопатологии выявило тенденцию к снижению абсолютного числа лимфоцитов (CD45⁺) и общей популяции Т-клеток (CD3⁺) в старшей возрастной группе (риск ВМД; AREDS1) по сравнению с молодыми людьми. Характерной особенностью группы здоровых лиц пожилого возраста явилось статистически значимое повышение практически в 2 раза как абсо-

лютного, так и относительного количества «дубль позитивных» (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) Т-лимфоцитов.

При исследовании субпопуляционного состава лимфоцитов крови пациентов с ВМД было обнаружено, что в обеих клинических группах (AREDS2 и AREDS3) происходило дальнейшее, статистически значимое повышение содержания (как абсолютного, так и процентного) этой субпопуляции Т-клеток (CD3⁺CD4⁺CD8⁺). Кроме того, начальная и промежуточная стадии ВМД характеризовались достоверным ростом количества В-лимфоцитов: абсолютного и относительного при AREDS2; абсолютного содержания при AREDS3 по отношению к контрольной группе молодых добровольцев и группе здоровых лиц пожилого возраста без офтальмопатологии. На стадии AREDS3 отмечалась тенденция к повышению процентного содержания цитотоксических (CD3⁺CD8⁺) Т-лимфоцитов. Полученные данные были подтверждены результатами индивидуального анализа (рис. 1А; Б; В).

Результаты исследования показали, что пожилой возраст, начальная и промежуточная стадии ВМД ассоциируются с более или менее выраженными сдвигами в субпопуляционном составе лимфоцитов крови по сравнению с контролем – здоровыми лицами молодого возраста («нормой»).

Так, если в группе риска ВМД (AREDS1; группа здоровых пожилого возраста) снижение содержания общего количества Т-лимфоцитов

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ МОЛОДОГО ВОЗРАСТА (КОНТРОЛЬ), ПОЖИЛОГО ВОЗРАСТА (РИСК РАЗВИТИЯ ВМД) И БОЛЬНЫХ ВМД (M±Σ)

Показатель		Контроль (n = 18)	AREDS1 (n = 11)	AREDS2 (n = 9)	AREDS3 (n = 9)
Лимфоциты CD45 ⁺	× 10 ⁹ /л	1,79±0,36	1,64±0,36	1,75±0,55	1,86±0,46
Т-лимфоциты (общая популяция) CD3 ⁺	%	72,6±6,7	70,8±7,4	67,6±9,0	71,3±6,8
	× 10 ⁹ /л	1,3±0,26	1,16±0,29	1,15±0,22	1,34±0,41
Т-хелперы CD3 ⁺ CD4 ⁺	%	42,5±7,9	44,1±5,1	43,2±5,1	41,7±7,2
	× 10 ⁹ /л	0,76±0,19	0,73±0,22	0,75±0,16	0,79±0,29
Т-цитотоксические CD3 ⁺ CD8 ⁺	%	24,7±3,8	23,6±6,1	23,5±3,4	26,5±3,9
	× 10 ⁹ /л	0,49±0,24	0,39±0,13	0,4 ±0,06	0,49±0,16
Т-«дубль позитивные» лимфоциты CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	%	0,54±0,31	1,27±0,8*	1,17±0,5*	1,14±0,67*
	× 10 ⁹ /л	0,009±0,007	0,019±0,01*	0,02±0,009*	0,022±0,014*
В-лимфоциты CD19 ⁺	%	10,57±3,11	11,7±0,6	17,2±6,8* **	16,3±4,9
	× 10 ⁹ /л	0,19±0,06	0,19±0,05	0,31±0,18* **	0,24±0,05* **
Натуральные киллеры CD16 ⁺ CD56 ⁺	%	16,3±7,4	17,0±6,7	14,9±6,1	14,6±3,2
	× 10 ⁹ /л	0,3±0,17	0,28±0,1	0,28±0,19	0,27±0,1
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ иммунорегуляторный индекс	рассч. ед.	1,78±0,54	2,0±0,6	1,86±0,14	1,62±0,4

Примечание. * – достоверность различия параметров у больных ВМД по сравнению с группой контроля (p<0,05),
** – достоверность различия параметров у больных с начальной (AREDS2) и промежуточной стадией (AREDS3) ВМД по сравнению с группой AREDS1 (p < 0,05)

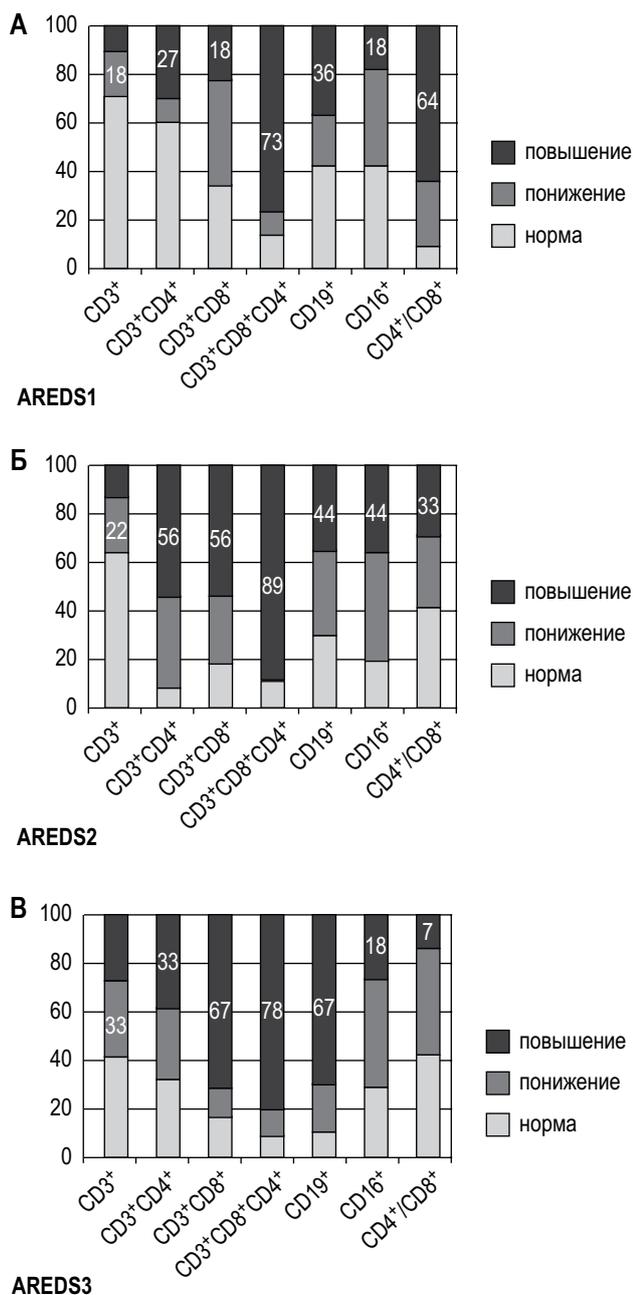


Рисунок 1. Частота случаев сдвигов от нормы (молодого контроля) в субпопуляционном составе лимфоцитов крови (относительное содержание): А – лиц пожилого возраста (группа риска [AREDS1]); Б – при начальной стадии ВМД (AREDS2); В – промежуточной стадии ВМД (AREDS3)

(CD3⁺) в крови было выявлено у 18% обследуемых, то при начальной (AREDS2) и далее промежуточной (AREDS3) стадиях ВМД – уже в 22 и 33% случаев соответственно.

В 73% случаев в группе здоровых пожилого возраста (AREDS1, группа риска ВМД) отмечено повышение относительного количества «дубль позитивных» Т-клеток, почти в поло-

вине случаев (45%) – снижение субпопуляции CD3⁺CD8⁺ и, как следствие последнего, повышение иммунорегуляторного индекса CD4⁺/CD8⁺ (в 64% случаев) (рис. 1А). Начальные изменения при AREDS2 (рис. 1Б) характеризовались дальнейшим достоверным увеличением частоты случаев повышения процентного содержания дубль-позитивных (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) лимфоцитов (89%); в 56% случаев отмечался рост субпопуляции Т-цитотоксических клеток (CD3⁺CD8⁺). Практически у половины пациентов этой группы отмечен рост относительного количества В-лимфоцитов. На промежуточной стадии (AREDS3) аналогичные сдвиги в субпопуляционном составе лимфоцитов были выявлены уже в гораздо большем числе случаев: CD3⁺CD8⁺ клетки и В-лимфоциты в 67% и субпопуляция «дубль позитивных» Т-клеток – в 78% случаев (рис. 1В).

Обобщение результатов исследования показало, что при переходе в начальную и далее в промежуточную стадию ВМД происходило снижение относительного количества CD3⁺ лимфоцитов: если в группе здоровых лиц пожилого возраста снижение этой популяции отмечалось в 18%, то при AREDS2 и AREDS3 уже в 22 и 33% случаев.

Таким образом, как при групповом, так и при индивидуальном анализе данных были выявлены нарушения в субпопуляционном составе лимфоцитов периферической крови как у здоровых лиц пожилого возраста, так и у пациентов с обеими стадиями ВМД (AREDS2; AREDS3), причем изменение клинической картины (от возрастных изменений к начальной и промежуточной стадиям ВМД) ассоциировалось с нарастанием частоты случаев характерных иммунологических сдвигов (рис. 1А, Б, В).

В нашей работе не была исследована влажная форма ВМД – стадия AREDS4, но выявленная динамика согласуется с данными Пановой И.Е. и соавт., указывающими на развитие иммунологической недостаточности по Т-звену иммунитета при далеко зашедших, терминальных стадиях ВМД [3].

При этом нарастание абсолютного и относительного количества CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD4⁺CD8⁺ субпопуляций, а также В-лимфоцитов и увеличение частоты их повышенного содержания в крови пациентов с начальной и промежуточной стадиями ВМД и здоровых лиц старшего возраста позволяют думать о возможной роли сдвигов в содержании данных субпопуляций как предпосылке развития иммунопатологических реакций, играющих важную роль в патогенезе ВМД.

Повышение относительного количества «дубль позитивных» (CD3⁺CD4⁺CD8⁺) Т-клеток,

выявленное нами в подавляющем большинстве случаев в группе «возрастного» контроля (группа риска ВМД, стадия AREDS1), согласуется с данными Самотыя Е. и соавт., показавшими увеличение содержания этой субпопуляции лимфоцитов в крови здоровых доноров пожилого возраста [5].

Обнаружение CD4⁺CD8⁺ клеток в периферической крови долгое время считалось неким артефактом, связанным с преждевременным выходом незрелых лимфоцитов из тимуса или признаком активации цитотоксических Т-лимфоцитов [11]. К настоящему времени установлено, что «дубль позитивные» Т-клетки являются высокодифференцированными клетками памяти. Помимо Т-цитотоксических (CD3⁺CD8⁺) лимфоцитов, субпопуляцию CD3⁺CD4⁺CD8⁺ клеток принято рассматривать в аспекте защиты от инфекций. Имеются сведения об увеличении CD4⁺CD8⁺ лимфоцитов в периферической крови при мононуклеозе, вызванном вирусом Эпштейна–Барр, ВИЧ-инфекции и др. Считается, что дубль-позитивные Т-лимфоциты могут иметь

большое значение в реакциях адаптивного иммунитета в ответ на различные инфекционные агенты [14].

Отмеченное нами увеличение частоты случаев повышения как CD3⁺CD8⁺, так и CD3⁺CD4⁺CD8⁺ субпопуляций в крови при начальной (AREDS2) и промежуточной (AREDS3) стадиях ВМД может служить определенным свидетельством влияния инфекционного фактора. Это согласуется с ранее полученными нами данными и мнением ряда других исследователей о возможной роли вирусов группы герпеса и хламидий как факторах, способствующих прогрессированию ВМД на фоне ослабления иммунитета [8, 12, 13].

Таким образом, в результате проведенных исследований представлена характеристика сдвигов в субпопуляционном составе лимфоцитов крови, связанных с процессом старения, возникновением и прогрессированием ВМД. Полученные данные представляются важными для расшифровки предпосылок развития, критериев прогнозирования, разработки дифференцированного подхода к лечению ВМД.

Список литературы / References

1. Егоров Е.А., Романенко И.А. Возрастная макулярная дегенерация. Вопросы патогенеза диагностики и лечения // Клиническая офтальмология, 2009. Т. 10, № 1. С. 42-45. [Egorov E.A., Romanenko I.A. Age-related macular degeneration. Issues of pathogenesis, diagnostics and treatment. *Klinicheskaya oftal'mologiya = Clinical Ophthalmology*, 2009, Vol. 10, no. 1, pp. 42-45. (In Russ.)]
2. Нероев В.В., Рябина М.В., Чиковани К.Р., Нероева Н.В. Современные представления и подходы к лечению возрастной макулярной дегенерации // Российский офтальмологический журнал, 2008. Т. 1, № 1. С. 6-9. [Neroyev V.V., Ryabina M.V., Chikovani K.R., Neroyeva N.V. Modern ideas and approaches to the treatment of age-related macular degeneration. *Rossiyskiy oftal'mologicheskiy zhurnal = Russian Ophthalmology Journal*, 2008, Vol. 1, no. 1, pp. 6-9. (In Russ.)]
3. Панова И.Е., Тонких Н.А., Прокопьева М.Ю., Бухтиярова Н.В. Возрастная макулярная дегенерация с неоваскулярным ответом: особенности клинического течения, характеристика клеточного иммунитета // Вестник ОГУ, 2004. № 13. Специальный выпуск. С. 246-248. [Panova I.E., Tonkih N.A., Prokopyeva M.Y., Bukhtiyarov N.V. Age-related macular degeneration with neovascular response: clinical features, characteristic of cellular immunity. *Vestnik OGU = Bulletin of OSU*, 2004, no. 13, Special edition, pp. 246-248. (In Russ.)]
4. Петруня А.М., Евсюкова О.А. Влияние иммуностропных препаратов на клеточный иммунитет у пациентов с сухой формой ВМД // Украинский медицинский альманах, 2012. Том 15, № 5. С. 128-132. [Petrunya A.M., Evsyukov A.A. The influence of immunotropic drugs on cellular immunity in patients with the dry form of AMD. *Ukrains'kiy medichniy al'manakh = Ukrainian Medical Almanac*, 2012, Vol. 15, no. 5, pp. 128-132.]
5. Самотыя Е. Двойные негативные (ДН) и двойные позитивные (ДП) Т-лимфоциты при раке и неопухолевых заболеваниях // Онкологический журнал (Республика Беларусь), 2011. Т. 5, № 3 (19). С. 145-146. [Samotyia E. Double-negative (DN) and double positive (DP) T cells in cancer and non-neoplastic diseases. *Onkologicheskiy zhurnal (Respublika Belarus') = Journal of Cancer (Republic of Belarus)*, 2011, Vol. 5, no. 3 (19), pp. 145-146.]
6. Adamus G., Chew E.Y., Ferris F.L., Klein M.L. Prevalens of anti-retinal autoantibodies in different stages of Age-related macular degeneration. *BMC Ophthalmol.*, 2014, Vol.14, p. 154.
7. Age-Related Eye Disease Study Research Group. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta-carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS. *Arch. Ophthalmol.*, 2001, Vol. 119, pp.1417-1436.
8. Cousins W.S., Espinosa-Heidmann D.G., Miller D.M., Pereira-Simon S., Hernandez E.P., Chien H., Meier-Jewett C., Dix R.D. Macrophage activation associated with chronic murine cytomegalovirus infection results

in more severe experimental choroidal neovascularisation. *PLoS Pathogens.*, 2012, Vol. 8, no. 4. Available at: <http://europepmc.org/articles/PMC3343109>

9. Ding J.D., Kelly U., Groelle M., Christenbury J.G., Zhang W., Bowes Rickman C. The role of complement dysregulation in AMD mouse models. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2014, Vol. 801, pp. 213-219.

10. Grunin M., Hagbi-Levi S., Chowers I. The role of monocytes and macrophages in age-related macular degeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2014, Vol. 801, pp. 199-205.

11. Jiménez E., Sacedón R., Vicente A., Hernández-López C., Zapata A.G., Varas A. Rat peripheral CD4⁺CD8⁺ T lymphocytes are partially immunocompetent thymus-derived cells that undergo postthymic maturation to become functionally mature CD4⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 168, pp. 5005-5013.

12. Kalayoglu M.V., Bulal D., Aarroyo J., Gragoudas E.S., Miller J.W. Identification of Chlamydia pneumoniae within human choroidal neovascular membranes secondary to age-related macular degeneration. *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, 2005, Vol. 243, no. 11, pp. 1080-1090.

13. Miller D.M., Ersinosa-Heidman D.G., Legra J., Dubovy S.R., Suner I.J., Sedmak D.D., Dix R.D., Cousins S.W. The association of prior cytomegalovirus infection with neovascular age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol.*, 2004, Vol. 138, no. 3, pp. 323-328.

14. Nascimbeni M., Shin E.C., Chiriboga L., Kleiner D.E., Rehmann B. Peripheral CD4(+)CD8(+) T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Blood*, 2004, Vol. 104, no. 2, pp. 478-486.

15. Toomey C.B., Kelly U., Saban D.R., Bowes Rickman C. Regulation of age-related macular degeneration-like pathology by complement factor H. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2015 May 19. pii: 201424391. [Epub ahead of print].

Авторы:

Балацкая Н.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, отдел иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Еремеева Е.А. — врач-офтальмолог, взрослое консультативно-поликлиническое отделение, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Слепова О.С. — д.б.н., профессор, начальник отдела Иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Рябина М.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, отдел патологии сетчатки и зрительного нерва, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Куликова И.Г. — старший научный сотрудник, отдел иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Сорожкина Е.С. — научный сотрудник, отдел иммунологии и вирусологии, ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Balatskaya N.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Department of Immunology and Virology, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Eremeeva E.A., Physician (Ophthalmology), Adult Advisory Out-patient Department, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Slepova O.S., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Department of Immunology and Virology, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Ryabina M.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of Pathology of Retina and Optic Nerve, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Kulikova I.G., Senior Research Associate, Department of Immunology and Virology, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Sorozhkina E.S., Research Associate, Department of Immunology and Virology, The Moscow Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Поступила 11.06.2015

Отправлена на доработку 29.06.2015

Принята к печати 01.07.2015

Received 11.06.2015

Revision received 29.06.2015

Accepted 01.07.2015

РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛ ДНК TREC И KREC В ЦЕЛЬНОЙ КРОВИ И СУХИХ ПЯТНАХ КРОВИ МЕТОДОМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Гордукова М.А.¹, Оскорбин И.П.^{2,3}, Мишукова О.В.², Зимин С.Б.¹,
Зиновьева Н.В.¹, Давыдова Н.В.¹, Смирнова А.С.¹, Никитина И.А.¹,
Корсунский И.А.¹, Филипенко М.Л.^{2,3}, Продеус А.П.¹

¹ ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

² Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

³ Новосибирский государственный исследовательский университет, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Первичные иммунодефициты (ПИД), тяжелый комбинированный иммунодефицит (ТКИН) и X-сцепленная агаммаглобулинемия, характеризуются отсутствием функциональных Т- и В-лимфоцитов соответственно. Без своевременной ранней диагностики и лечения дети с ПИД страдают от инфекционных заболеваний с тяжелым течением, что приводит к их инвалидизации или смерти.

Цель: разработать и апробировать на группе детей с верифицированными диагнозами ТКИН и X-сцепленной агаммаглобулинемией простую, недорогую, высокопропускную методику на основе количественного определения молекул ДНК TREC и KREC с помощью ПЦР в режиме реального времени.

В настоящем исследовании мы разработали и валидировали метод проведения мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме «реального времени» для количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC. Нами было показано, что в области концентраций от 10^9 коп/мл до 5×10^4 коп/мл для всех мишеней наблюдается линейный диапазон изменения Ct в зависимости от концентрации с коэффициентом корреляции R^2 не хуже 0,98. Наименьшее количество копий, надежно детектиру-

Адрес для переписки:

Гордукова Мария Александровна
ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9
им. Г.Н. Сперанского
123317, Россия, Москва, Шмитовский проезд, 29.
Тел.: 8 (499) 256-21-62.
Факс: 8 (499) 256-61-27.
E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

Address for correspondence:

Gordukova Maria A.
G.N. Speranskiy Children Hospital No 9
123317, Russian Federation, Moscow, Shmitovskiy str., 29.
Phone: 7 (499) 256-21-62.
Fax: 7 (499) 256-61-27.
E-mail: ma.gordukova@dgkb-9.ru

Образец цитирования:

М.А. Гордукова, И.П. Оскорбин, О.В. Мишукова, С.Б. Зимин, Н.В. Зиновьева, Н.В. Давыдова, А.С. Смирнова, И.А. Никитина, И.А. Корсунский, М.Л. Филипенко, А.П. Продеус, «Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478

© Гордукова М.А. и соавт., 2015

For citation:

M.A. Gordukova, I.P. Oskorbin, O.V. Mishukova, S.B. Zimin, N.V. Zinovieva, N.V. Davydova, A.S. Smirnova, I.A. Nikitina, I.A. Korsunsky, M.L. Filipenko, A.P. Prodeus, "Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 467-478. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-467-478>

емых в одной ПЦР реакции объемом 25 мкл, было: 10 для TREC, 5 для KREC и 5 для внутреннего контроля – локуса IL17RA. Нами определены референсные значения для количества TREC и KREC в цельной крови в зависимости от возраста в группе из 29 мальчиков и 27 девочек с нормальными иммунологическими параметрами. Были определены граничные значения для содержания TREC и KREC в сухих пятнах крови в зависимости от метода экстракции ДНК.

Предложенная методика показала 100% диагностическую чувствительность и специфичность на исследуемой выборке. Метод может быть предложен как скрининговый для диагностики ТКИИ и X-сцепленной агаммаглобулинемии как в цельной крови, так и в сухих пятнах крови. Требуется дальнейшая апробация методики на выборках большего объема.

Ключевые слова: первичный иммунодефицит, диагностика, TREC, KREC, количественная ПЦР

DEVELOPMENT OF REAL-TIME MULTIPLEX PCR FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TREC'S AND KREC'S IN WHOLE BLOOD AND IN DRIED BLOOD SPOTS

Gordukova M.A.^a, Oskorbin I.P.^{b,c}, Mishukova O.V.^b, Zimin S.B.^a,
Zinovieva N.V.^a, Davydova N.V.^a, Smirnova A.S.^a, Nikitina I.A.^a,
Korsunsky I.A.^a, Filipenko M.L.^{b,c}, Prodeus A.P.^a

^a G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

^c Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Primary immunodeficiencies (PID) such as severe combined immunodeficiency (SCID) and X-linked agammaglobulinemia are characterized by the lack of functional T- and B-cells, respectively. Without early diagnosis and prompt treatment children with PID suffer from severe infectious diseases, leading to their death or disability. Our purpose was developing of simple, inexpensive, high throughput technique based on the quantitative determination of TREC and KREC molecules by real-time PCR, and its validation in a group of children with a verified diagnosis of SCID and X-linked agammaglobulinemia.

In this study, we developed and validated multiplex real-time PCR for the TREC's and KREC's quantitative analysis. We have shown that linear range of Ct changes depending on the concentrations of targets with a correlation coefficient R^2 not worse than 0.98 was observed at concentrations from 10^9 to 5×10^4 copies per ml. The lowest amount of targets reliably detected in a reaction volume was 10 TREC's copies, 5 KREC 's copies and 5 copies of internal control (IL17RA). We determined the age-depended reference values of TRECs and KRECs in whole blood in 29 boys and 27 girls with normal immunological parameters. The normal cut-offs for TRECs and KRECs were defined in dry blood spots depending on the method of extraction.

The proposed method showed 100% diagnostic sensitivity and specificity in the studied group. The method can be proposed as a screening tool for the diagnosis of SCID and X-linked agammaglobulinemia both in whole blood and in the dry blood spots. The further investigation is required with larger number of samples.

Keywords: primary immunodeficiency, diagnostics, TREC, KREC, real-time PCR

Сокращения: TRECs – T cell receptor (TCR) excision circles – эксцизионное кольцо T-клеточного рецептора; KREC- kappa-deleting recombination excision circle – рекомбинационное кольцо каппа-делеционного элемента; ТКИИ – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность; ОВИИ – общая вариабельная иммунная недостаточность.

Введение

Созревание функциональных Т- и В-клеток человека сопровождается рекомбинацией и перестройками в генах, кодирующих Т- (TCR) и В- (BCR) клеточные рецепторы [1, 2]. Так, для сборки полноценного Т-клеточного рецептора должна произойти перестройка локуса TCRB, в ходе которой происходит соединение D и J сегмента и последующее присоединение V сегмента, и также слияние V и J сегментов локуса TCRA. При этом образуется третий гипервариабельный домен (CDR3) бета- и альфа-цепи соответственно. Во время каждого из этих процессов вырезаемые участки образуют эксцизионные кольца ДНК, получившие название TRECs (TCR rearrangement excision circles). В соответствии с числом сегментов Va, Ja, Vb, Db и Jb могут образовываться разные типы TRECs: несколько сот различных TRECs при Va-Ja рекомбинации, десятки для Vb-Db и, по крайней мере, 13 для Db-Jb. Во время перестройки TCRA локуса в большинстве незрелых Т-лимфоцитов происходит делеция TCRD локуса, находящегося внутри и фланкированного V и J сегментами. Этот процесс является специфичным и проходит при участии делеционных последовательностей δ Rec и Ψ J α . Генерируемая при этом кольцевая молекула была названа sjTREC (signal joint TCR rearrangement excision circle), она присутствует практически у всех $\alpha\beta^+$ Т-лимфоцитов, выходящих из тимуса, и, таким образом, может служить суррогатным маркером их количества [3].

Процесс формирования функционального рецептора в В-клетках начинается с рекомбинационных событий в IGH локусе, несущем набор различных Vh, D и Jh сегментов, в котором также генерируется большое количество эксцизионных колец ДНК [4]. Если перестройка прошла правильно, начинается рекомбинация в IGK локусе, кодирующем последовательности легкой каппа-цепи иммуноглобулинов. Она начинается слиянием Vk и Jk сегментов и в дальнейшем может сопровождаться рекомбинацией с участием интронной рекомбинационной последовательности (Jk-Ск intronRSS) и каппа-делеционным элементом (Kde), что делает каппа-локус нефункциональным, ввиду делеции энхансера и константного района [5]. Данная перестройка ведет к образованию рекомбинационного кольца каппа-делеционного элемента, или KREC (каппа-deleting recombination excision circle), ко-

торое присутствует в 30% $Ig\kappa^+$ и почти всех $Ig\lambda^+$ зрелых наивных В-лимфоцитах [5]. ДНК KREC также может быть суррогатным маркером зрелых наивных В-лимфоцитов, а также использоваться для оценки их пролиферативной истории [6].

Количество TREC и KREC может быть оценено с помощью количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени (ПЦР-РВ) и, ввиду прямого маркирования зрелых наивных Т- и В-лимфоцитов, имеет высокий диагностический потенциал. Количественный анализ TREC активно применяется для оценки функции тимуса и неогенеза Т-клеток. Он был использован для диагностики иммунодефицитов [7], для неонатального скрининга ПИД у новорожденных [8], и как предиктор восстановления Т-клеточной функции после пересадки костного мозга [9].

Квантификация TREC с помощью ПЦР в режиме реального времени и конструирование плазмиды, несущей фрагмент TREC, необходимой для построения калибровочной кривой, была описана Douek с соавторами еще в 1998 году [3]. В дальнейшем были предложены другие варианты ПЦР-РВ (моноплексные и мультиплексные с мишенью, отражающей количество геном-эквивалентов в исследуемой ДНК), при этом для некоторых из них была проведена достаточно тщательная аналитическая и клиническая валидация.

Например, в работе [10] пытались оценить возможность применения количественного анализа TREC в ДНК, полученной из Guthrie-карточек, применяемых рутинно в скрининге новорожденных (примерно 3 мкл крови). Авторы показали, что тест адекватен для выявления новорожденных детей с ПИД, и в настоящее время он применяется для этих целей в штате Висконсин, США. Для анализа авторы использовали систему, предложенную в работе Douek et al., 1998 [3]. Sottini с соавторами предложили одновременное определение TREC и KREC, но в дуплексном варианте и только с использованием прибора 7500 FastReal-Time PCR (Applied Biosystems) [11]. Авторы декларировали аналитическую чувствительность не менее 10 молекул TREC и KREC в реакции. Borte et al. в 2012 использовали систему Sottini et al., 2010 в триплексном варианте [12]. Однако авторы не привели аналитических характеристик их варианта системы, выставляя довольно низкие уровни отсечения – 15 TRECs/мкл и 10 KRECs/мкл для скрининга врожденных иммунодефицитов. Они также использовали только

приборы ABI 7500 и ViiA7 от Applied Biosystems. Кроме этого, работа содержит явные ошибки и разночтения. Таким образом, описанная авторами система не может быть использована без дальнейшего ее улучшения и адаптации.

Задача, решаемая в нашей работе, заключалась в разработке высокочувствительного метода для одновременного определения концентрации TREC и KREC как в образцах ДНК из периферической крови, так и ДНК, полученной из сухих пятен крови, собираемых в ходе национальной программы скрининга новорожденных.

Материалы и методы

Образцы и экстракция ДНК

Исследование было одобрено этическим ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского в последней редакции 25 сентября 2014 года (протокол № 5). От родителей несовершеннолетних пациентов было получено информированное согласие.

Образцы от условно здоровых детей разного возраста без иммунодефицитных состояний были получены из поликлинического отделения ДГКБ №9. Все образцы цельной крови от этих детей были исследованы не только помощью ПЦР-РВ для определения количества TREC и KREC, но и с применением метода проточной цитометрии, а также у них были определены сывороточные иммуноглобулины для того, чтобы подтвердить, что все иммунологические параметры у них находятся в норме по возрасту. Всего было исследовано 29 образцов крови от мальчиков и 27 образцов крови от девочек для определения граничных значений нормы TREC и KREC в цельной крови в зависимости от возраста и метода экстракции ДНК.

Образцы от пациентов с ПИД – ТКИН и X-сцепленной агаммаглобулинемией – были собраны в период с 2007 по 2014 год в отделении иммунопатологии ДГКБ №9. Всего в исследование вошли 8 детей с диагнозом ПИД, ТКИН и 7 детей с X-сцепленной агаммаглобулинемией. При этом всем детям наряду с анализом TREC и KREC стандартно проводились общий анализ крови, иммунофенотипирование и определение сывороточных иммуноглобулинов. Дети с X-сцепленной агаммаглобулинемией получают терапию внутривенными иммуноглобулинами в отделении иммунопатологии ДГКБ № 9, в связи с чем были госпитализированы неоднократно. При каждой госпитализации уровень

IgM и IgA в сыворотке у таких больных не превышал 0,05 г/л. Повторная госпитализация детей с X-сцепленной агаммаглобулинемией дала возможность апробировать предложенный метод оценки копий TREC и KREC в динамике и продемонстрировать стабильность работы этой системы.

В связи с тем, что среди коммерчески доступных наборов реагентов для экстракции ДНК не так много тех, которые позволяют работать с сухими пятнами, с целью выбора набора реагентов и установления нормальных значений TREC и KREC в сухих пятнах были созданы искусственные сухие пятна крови, симулирующие реальные пятна, получаемые в ходе скрининга новорожденных. Для создания таких пятен была взята цельная кровь от условно здоровых детей первого года жизни с известными, нормальными значениями TREC и KREC. Кроме того, этим детям был проведен анализ клеточного иммунного статуса, который доказал, что все показатели у них находились в норме по возрасту. Вместе с тем, для того, чтобы можно было достоверно отличить норму от патологии, для создания сухих пятен крови также применялась кровь с различными количествами копий TREC с шагом в порядок: 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 и 0 копий TREC на 10^5 ДНК-содержащих клеток крови. Цельная кровь в объеме 50 мкл наносилась на чистые карты новорожденных 903 Wallac Russia CE Card (GE Healthcare Bio-Sciences Corp, США), и после высушивания и хранения таких карт в течение недели из карт с помощью дырокола Harris UNI-CORE (Qiagen GmbH, Германия) вырезались одинаковые диски. Из них была выделена ДНК с использованием рекомендованного в зарубежных работах [11, 13] набора QIAamp DNA Investigator Kit (Qiagen GmbH, Германия), а также комплектов реагентов для экстракции РНК/ДНК из клинического материала «АмплиПрайм РИБО-преп» и «АмплиПрайм РИБО-сорб» («НекстБио», Россия). Экстракцию проводили согласно инструкции производителя с некоторыми модификациями, а именно на стадии после лизиса и до стадии преципитации ДНК удаляли из раствора остатки бумаги. Это достигалось путем перенесения лизата на другую пробирку, содержащую раствор для преципитации. Дальнейшая процедура экстракции не отличается от инструкции производителя. Объем элюции в случае сухих пятен крови составляет 50 мкл с целью концентрирования образца ввиду малого количества материала.

Нуклеиновые кислоты из образцов цельной крови выделяли «ручным» методом и с помощью автоматической станции. Для «ручной» экстракции использовали комплект реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп» («НекстБио», Россия). Объем исследуемого материала составлял 100 мкл, ДНК элюировали также в 100 мкл РНК-буфера, входящего в состав набора реагентов. Для автоматической экстракции ДНК из 200 мкл цельной крови применяли комплект реагентов «Prepito viral NA/gDNA KIT» на станции Prepito (PerkinElmer, США), ДНК элюировали в 80 мкл буфера.

Фенотипическая характеристика пациентов методом проточной цитофлуорометрии

Иммунофенотипирование лимфоцитов (CD3⁺; CD4⁺; CD8⁺; CD16⁺CD56⁺; CD19⁺) осуществляли методом проточной лазерной цитометрии с использованием моноклональных антител фирмы BD Biosciences с помощью проточного цитометра BD FACSCanto™ II (BD Biosciences, Le Pont de Claix), данные анализированы с помощью BD FACSDiva software version 7.0 (BD Biosciences, San Jose, CA).

Получение стандартных плазмидных образцов

Фрагменты TREC, KREC и гена IL17RA для конструирования стандартных образцов амплифицировали с помощью праймеров, приведенных в таблице 1, в следующих условиях: реакционная смесь ПЦР объемом 50 мкл содержала: 1х буфер для Taq-полимеразы (65 mM Tris-HCl (pH 8,9); 16 mM (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 mM MgCl₂), 0,2 mM дНТФ, 50 нг геномной ДНК человека, 1 е.а. Taq-полимеразы (Биосан), 0,5 е.а. Pfu-полимеразы (Биосан). Амплификацию проводили в амплификаторе «Терцик» (ДНК-технология) согласно следующей программе: 3 мин при 95 °С начальной денатурации, 35 циклов: 10 с при 95 °С для денатурации, 10 с при 60 °С для гибридизации праймеров, 40 с при 72 °С для элонгации.

Продукты амплификации с праймерами TREC3/TREC4 длиной 1192 п.н., IL17Ra3/IL17Ra4 длиной 455 п.н. и KREC3/KREC4 длиной 482 п.н. гидролизовали эндонуклеазой рестрикции HindIII (Сибэнзим, г. Новосибирск) и лигировали с вектором pBluscriptII SK(+), гидролизованным той же эндонуклеазой, в течение 3-х часов с 100 ед. акт. Т4 ДНК-лигазы (Биосан). Лигазной смесью трансформировали компетентные клетки *E. coli* штамма XL1-Blue (Stratagene). У плазмидных клонов, отобранных по результатам рестрикционного анализа, для подтвержде-

дения структуры определяли нуклеотидную последовательность вставки секвенированием по методу Сенгера. Секвенирование было выполнено на автоматическом секвенаторе ABI 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием набора Big dye 3.1 (Центр коллективного пользования «Геномика», ИХБФМ СО РАН). Плазмидные ДНК (pST-TREC, pST-KREC и pST-IL17RA) выделяли из 100 мл ночной культуры в среде LB с помощью QIAGEN Plasmid Midi Kit (QIAGEN) согласно инструкции фирмы-производителя.

Получение калибраторов

Концентрацию полученных стандартных плазмидных ДНК определяли спектрофотометрически и флуорометрически (набор Qubit™ BR, Invitrogen). А именно – 2 мкг ДНК подвергали гидролизу эндонуклеазой рестрикции EcoRI для линейаризации. Полученные линейные стандарты разводили до концентрации 10⁷-10¹ копий плазмидной ДНК на мкл в стерильном буфере, содержащем 10 mM TrisHCl pH7.6 и ДНК фага лямбда 5 нг на мкл. Концентрацию ДНК в полученных стандартах уточняли с использованием цифровой ПЦР на платформе QX100™ Droplet Digital™ PCR System (Bio-Rad, США) согласно инструкциям фирмы-производителя. Для этого готовили 20 мкл ПЦР-смеси, содержащей исследуемую ДНК (< 66 нг на 20 мкл), 1х ПЦР-смесь (Bio-Rad), 300 нМ олигонуклеотидные праймеры и 100 нМ Taq-man зонд. Для получения микрокапель 20 мкл приготовленной ПЦР-смеси и 70 мкл масла для генерации капель помещали в соответствующие лунки картриджа DG8. 40 мкл полученных микрокапель переносили 96-луночную ПЦР плашку, запечатывали фольгой и помещали в амплификатор. Программа амплификации: 96 °С – 10 мин и далее 50 циклов 96 °С – 15 с, 60 °С – 40 с с финальным прогревом в течение 10 мин при 98 °С. После это микрокапли подвергали считыванию с помощью прибора Droplet Reader, полученные данные обрабатывали в программе QuantaSoft (Bio-Rad, США).

Количественный анализ TREC и KREC методом ПЦР-РВ

Для количественного анализа TREC и KREC проводили мультиплексную ПЦР-РВ. Смесь для ПЦР (объемом 25 мкл) содержала олигонуклеотидные праймеры (см. табл. 1) TREC2fo, TREC2re, KREC3 и KREC4 – 0,3 мкМ; IL17RA-U и IL17RA-R – 0,25 мкМ, флуоресцентно-меченые зонды TRECp2 и KREC4p – 0,2 мкМ,

IL17RA-P – 0,15 мкМ, а также 1х буфер для Таq-полимеразы (65 мМ Tris-HCl (pH 8,9); 16 мМ (NH₄)₂SO₄; 0,05% Tween 20; 3,5 мМ MgCl₂), 0,2 мМ дНТФ, 1 е.а. Таq-полимеразы («Биосинтек», Россия) и геномную ДНК человека. Реакцию амплификации проводили в амплификаторах CFX96 (Bio-Rad, США), Rotor-Gene 3000 (Corbett Research, Австралия) и ABI 7500 (Applied Biosystems, США) согласно следующей программе: 15 мин при 95 °С начальной денатурации для активации фермента, 4 цикла: 10 с при 95 °С для денатурации, 30 с при 61 °С для гибридизации праймеров, 15 с при 72 °С для элонгации, далее 39 циклов: 10 с при 95 °С, 30 с при 60 °С, съём флуоресцентного сигнала на каналах FAM/HEX/ROX, 15 с при 72 °С. Для каждого образца анализ проводили в трех повторах, для построения калибровочной кривой использовали стандартные образцы 10⁷, 10⁵, 5 × 10³ копий на мл. Количество копий анализируемых ДНК мишеней рассчитывали по формуле, выведенной из графика калибровочной кривой с помощью программного обеспечения к соответствующему прибору.

Клиническую интерпретацию количества копий TREC/KREC проводили с учетом определенных геном-эквивалентов ядродержащих клеток крови (копии IL17RA) по формуле: Кол-во TREC(KREC) = (кол-во копий TREC(KREC) на мл / кол-во копий IL17RA)*200000 (для экстракции с помощью комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп»).

Результаты

Выбор олигонуклеотидных праймеров и зондов, оптимизация условий мультиплексной ПЦР

На первом этапе работы мы попытались использовать для квантификации TREC в образцах геномной ДНК человека последовательности олигонуклеотидных праймеров и зондов, описанные в работе Baker et al., 2009 [10] (табл. 1). Однако указанная система в нашем исполнении обладала недостаточной эффективностью амплификации (данные не приведены). Праймеры и зонды для ПЦР подобраны с учетом структур TREC и KREC таким образом, чтобы исключить отжиг на матрице геномной ДНК (перестроенной и не перестроенной в Т- и В-лимфоцитах и в любых других клетках человека не лимфоцитарного

ТАБЛИЦА 1. НУКЛЕОТИДНЫЕ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ОЛИГОНУКЛЕОТИДНЫХ ПРАЙМЕРОВ И Таq-man ЗОНДОВ

№	Название	Последовательность
1	TREC2FO	5'-GTGATGCCACATCCCTTTCAA-3'
2	TREC2RE	5'-ACGGTGAATGAAGAGCAGACA-3'
3	TRECP2	5'-FAMCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCC-BHQ-3'
4	KREC3	5'-GTTCTCTTTCCCTTAGTGGCA-3'
5	KREC4P	5' – R6G- CCAGCTCTTACCCTAGAGTTTCTG- BHQ-3'
6	KREC4	5'-CTGGGTGGGACTCCAGGA-3'
7	IL17RA-U	5'-CTTGATGCTCTCGCTCTTCG-3'
8	IL17RA-R	5'-TGTAGCCCTGGTCAGACTG-3'
9	IL17RA-P	5'-ROX-CTGCCGCTGCTCCTCCTCG-BHQ-3'
10	IL17-RA3	5'-CCAAAGCTTCTCTGACCCCATCGTGTCC-3'
11	IL17-RA4	5'-CCGAAGCTTGAAATAGCGTCTCTTCCTC-3'
12	TREC3	5'-CCAAAGCTTCCCTGGTTGACTATGTGTGAC-3'
13	TREC4	5'-GCAAAGCTTCAGAGGTTGGGACAGAAAAG-3'
		Baker et al., 2009
14	TREC1	5'-CACATCCCTTTCAACCATGCT-3'
15	TREC2	5'-GCCAGCTGCAGGGTTTAGG-3'
16	TRECP	5'-FAM-ACACCTCTGGTTTTTGTAAAGGTGCCCACT-FQ-3'
17	B-ACTINU	5'-ATTCCTCTCAGGCATGGA-3'
18	B-ACTINR	5'-CGTCACACTTCATGATGGAGTTG-3'
19	B-ACTINP	5'-R6G-GTGGCATCCACGAAACTA-FQ-3'

ряда), а также с учетом минимизации образуемых в мультиплексной реакции праймер-димеров. При этом пары праймеров подбирались с учетом того, что желаемая длина ампликона лежала в пределах от 80 до 180 п.о.

В результате нами были разработаны 3 пары олигонуклеотидных праймеров (табл. 1) для количественного определения TREC, KREC и гена IL-17га (стандартный однокопийный геномный локус для определения количества геном-эквивалентов ДНК в образце), показывающие приемлемую эффективность амплификации (более 90%) как в моноплексном, так и в мультиплексном варианте проведения ПЦР. Оптимизация условий ПЦР-РВ включала подбор оптимальных концентраций олигонуклеотидных праймеров и зондов, параметров программы амплификации и концентрацию ионов магния. Для повышения чувствительности и специфичности ПЦР был применен «горячий старт», который обеспечивается использованием химически модифицированной Taq-полимеразы. Оптимальные параметры разработанной системы приведены в разделе «Материалы и методы».

Аналитическая характеристика разработанной системы для количественного анализа TREC и KREC

Для проверки специфичности разработанной ПЦР использовали ДНК клеточных линий нелимфоидного происхождения, несущих неперестроенные Т- и В-клеточные рецепторы, а именно – HEK293, HeLa, H460, а также образцы гДНК из мочи и слюны. По результатам проведенного тестирования специфичность составила 100%.

Линейный диапазон количественного определения копийности TREC, KREC и IL17RA определяли с помощью ПЦР на разведениях стандартных плазмид от 10^9 коп/мл до 10^3 коп/мл, при этом обращали внимание на коэффициент R^2 и разброс значений St для повторов (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки). Нами было показано, что в области концентраций от 10^9 коп/мл до 5×10^4 коп/мл для всех трех мишеней наблюдается линейный диапазон изменения St от концентрации с коэффициентом корреляции R^2 не хуже 0.98. Наименьшее количество копий, надежно детектируемых в одной ПЦР реакции объемом 25 мкл, было: 10 для TREC, 5 для KREC и 5 для IL17RA.

Далее мы оценивали чувствительность системы, моделируя весь процесс анализа крови пациента. Для этого была взята кровь от больного

с ТКИН (возраст 7 мес., фенотип Т-В⁺НК⁻, с содержанием CD3⁺ = 1,1%, абсолютное число – 5 клеток/мкл крови). Анализ ДНК этого пациента с помощью ПЦР не выявил TREC. Были подобраны образцы крови от детей с возрастом до 1 года с количеством CD3⁺ клеток от 60 до 70% (абс. число – 3800-5000 кл/мкл). Для нивелирования эффекта разброса, был приготовлен пулированный образец путем объединения 50 мкл крови от каждого условно здорового донора. Образцы пулированной крови были разбавлены кровью от больного с ТКИН в различных соотношениях от 1% до 100%, и из 100 мкл реконструированных образцов крови была выделена ДНК с использованием комплекта реагентов «АмплиПрайм РИБО-преп». Дальнейший ПЦР-анализ показал, что система может воспроизводимо оценивать количество молекул TREC в модельных образцах крови, содержащих всего 10% крови здоровых детей (табл. 2). Можно заключить, что 10 мкл крови достаточно для проведения подобного анализа.

Аналогичный эксперимент был проведен для мишени KREC. Пулированный образец крови от больных агаммаглобулинемией был получен путем объединения 100 мкл крови 4-х больных, у которых по результатам иммунофенотипирования полностью отсутствовали В-клетки (CD19⁻) как в процентном, так и в абсолютном исчислении. Усредненный нормальный образец крови был получен путем объединения равных количеств крови от 4-х условно здоровых детей. Искусственно реконструированные образцы крови с разными концентрациями наивных В-лимфоцитов, в результате смешения в разных

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ РАЗРАБОТАННОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ НА МОДЕЛЬНЫХ ОБРАЗЦАХ КРОВИ, СОДЕРЖАЩИХ РАЗНОЕ ПРОЦЕНТНОЕ СОДЕРЖАНИЕ МОЛЕКУЛ TREC И KREC ОТ НОРМЫ

Кровь здоровые дети, %	100	50	40	30	20	10	5	1
TREC на 10^5 лейкоцитов	$6,15 \times 10^4$	$2,20 \times 10^4$	$1,10 \times 10^4$	$2,53 \times 10^3$	$7,83 \times 10^3$	$2,78 \times 10^3$	$3,09 \times 10^3$	$4,93 \times 10^2$
KREC на 10^5 лейкоцитов	$3,56 \times 10^3$	$4,47 \times 10^3$	$3,25 \times 10^3$	$1,22 \times 10^3$	$2,03 \times 10^3$	$7,25 \times 10^2$	$7,71 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$

пропорциях вышеописанных пулов, были использованы для экстракции ДНК и ПЦР анализа (табл. 2). Предложенная система надежно детектировала мишень KREC при содержании нормальной крови 1%.

Определение референсных значений для TREC и KREC в зависимости от возраста

Для определения референсных значений для TREC и KREC в зависимости от возраста использовали ДНК, полученную из образцов крови от 56 условно здоровых детей (29 мальчиков и 27 девочек) разного возраста с нормальными иммунологическими параметрами (табл. 3).

Нами не было получено статистически значимых различий значений TREC и KREC в зависимости от пола (критерий Краскела–Уоллиса и Джонкхиера–Терпстра, $p > 0,05$), что позволило объединить выборки девочек и мальчиков только по признаку возраста.

Полученные референсные значения приведены в таблицах 4 и 5.

ТАБЛИЦА 3. ОПИСАНИЕ ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПАРАМЕТРОВ ДЕТЕЙ, ВЫБРАННЫХ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РЕФЕРЕНСНЫХ ЗНАЧЕНИЙ TREC И KREC

	Характеристика	Значения
1	Возраст детей	0-17 лет
2	CD3 ⁺	58-60% 1300-4800 кл/мкл
3	CD3 ⁺ CD4 ⁺	31-54% 700-3500 кл/мкл
4	CD3 ⁺ CD8 ⁺	16-38% 500-1040 кл/мкл
5	CD19 ⁺	16-27% 400-1600 кл/мкл

ТАБЛИЦА 4. ВОЗРАСТНЫЕ НОРМЫ TREC НА 10⁵ КЛЕТОК ЛЕЙКОЦИТОВ

TREC	0-1 год	1-6 лет	6-12 лет	12-18 лет
Макс.	$1,6 \times 10^5$	$3,2 \times 10^5$	$7,9 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$
Мин.	$1,2 \times 10^5$	$1,4 \times 10^4$	$7,3 \times 10^3$	$2,3 \times 10^3$
Среднее	$1,40 \times 10^5$	$3,38 \times 10^4$	$3,86 \times 10^4$	$5,73 \times 10^3$

ТАБЛИЦА 5. ВОЗРАСТНЫЕ НОРМЫ KREC НА 10⁵ КЛЕТОК ЛЕЙКОЦИТОВ

KREC	0-17 лет
Макс.	$1,0 \times 10^5$
Мин.	$1,0 \times 10^3$
Среднее	$1,0 \times 10^4$

Диагностическая характеристика разработанной системы для количественного анализа TREC и KREC

В связи с отсутствием скрининговой программы в нашей стране, вероятно, большее количество недиагностированных детей с ТКИН погибает на первом году жизни от генерализованных вирусно-бактериальных инфекций ввиду отсутствия проведения специализированного лечения, поэтому, несмотря на описанную частоту встречаемости ТКИН от 1:50000 до 1:100000 новорожденных [8], в коллекции образцов крови от детей с ПИД, собранной с 2007 по 2014 год, было всего 8 образцов от детей с ТКИН. Результаты иммунофенотипирования для них приведены в таблице 7, а результаты количественного определения TREC и KREC – в таблице 8. Для 7 из 8 образцов не было получено сигнала амплификации по каналу TREC, и лишь у одного пациента ЦН были обнаружены TREC в количестве $9,40 \times 10^1$ копий на 10^5 клеток, при норме от $1,2 \times 10^5$ до $1,6 \times 10^5$ коп/10⁵ клеток. Такой результат может быть объяснен ненулевыми количествами CD3⁺CD4⁺, которых было 3%,

ТАБЛИЦА 6. ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОЙ ОЦЕНКИ TREC И KREC

Исследование и дифференциальная диагностика лимфопений, ТКИН ¹ , ОВИН ² , агаммаглобулинемии и других ИДС, например, синдрома ДиДжорджи, атаксии телеангиэктазии (синдром Луи–Бар), синдрома Оменна, синдрома Вискотта–Олдрича, синдрома Ниймеген
Скрининг новорожденных с использованием сухих пятен крови на ТКИН и агаммаглобулинемию
Изучение нормального развития Т- и В-лимфоцитов
Оценка восстановления иммунной системы после проведения процедуры трансплантации гемопоэтических стволовых клеток костного мозга
Оценка реактивных состояний организма при угрозе жизни пациента (сепсис, менингит)
Изучение ответа на ВААРТ при ВИЧ-инфекции
Оценка возрастных изменений организма и определение возраста (судебная медицина)
Оценка активности аутоиммунного заболевания

Примечание. ¹ – ТКИН – тяжелая комбинированная иммунная недостаточность. ² – ОВИН – общая вариабельная иммунная недостаточность.

ТАБЛИЦА 7. ДАННЫЕ ИММУНОФЕНОТИПИРОВАНИЯ У ДЕТЕЙ С ПИД, ТКИН

Пациент	CD3 ⁺ CD4 ⁺		CD3 ⁺ CD8 ⁺		CD3 ⁺		CD19		CD16 ⁺ CD56 ⁺	
	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл	%	кл/мкл
ДК	0	0	0	0	10	730	74	540	2	15
ЦН	3	85	2	57	5	142	57	1624	24	684
ДИ	0,82	4	0	0	1,1	5	83	378	0,8	4
ТА	0,15	0	0,05	0	0,6	0	73	621	0,7	0
НМ	1,9	4	0	0	2	5	50	113	15	34
ДД	36	673	1	17	40	748	0,5	10	49	916
НГ	0	0	0	1	1,3	2	3	5	77	131
ДН	16,6	161	1	7	17	165	80	775	2	19

ТАБЛИЦА 8. ДАННЫЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ТРЕС И КРЕС У ДЕТЕЙ С ПИД, ТКИН

Пациент	Возраст, лет	Пол	Фенотип	ТРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов	КРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов
ДК	0,6	м	T-B ⁺ NK ⁻	не обнаружено	2,35 × 10 ¹
ЦН	0,5	м	T-B ⁺ NK ⁺	9,40 × 10 ¹	3,71 × 10 ⁴
ДИ	0,6	м	T-B ⁺ NK ⁻	не обнаружено	1,46 × 10 ⁴
ТА	0,9	м	T-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	2,52 × 10 ³
НМ	2,5	м	T-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	2,58 × 10 ³
ДД	0,3	ж	CD8-B ⁻ NK ⁺	не обнаружено	не обнаружено
НГ	0,1	ж	T-B ⁻ NK ⁺	не обнаружено	1,07 × 10 ¹
ДН	0,4	ж	CD8-B ⁺ NK ⁺	не обнаружено	1,05 × 10 ⁴
Нормальные значения				1,2 × 10 ⁵ – 1,6 × 10 ⁵	1,0 × 10 ³ – 1,0 × 10 ⁵

ТАБЛИЦА 9. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ТРЕС И КРЕС В ДИНАМИКЕ У ПАЦИЕНТА ШД С Х-СЦЕПЛЕННОЙ АГАММАГЛОБУЛИНЕМИЕЙ

Дата забора крови	Возраст, лет	ТРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов	КРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов
13.11.2012	14,8	5,57 × 10 ⁴	не обнаружено
25.04.2013	15,2	2,22 × 10 ⁵	не обнаружено
06.06.2013	15,4	4,26 × 10 ⁴	не обнаружено
22.01.2014	15,9	2,21 × 10 ⁴	не обнаружено
23.12.2014	16,9	1,90 × 10 ⁴	не обнаружено
24.03.2015	17,1	4,19 × 10 ⁴	не обнаружено

ТАБЛИЦА 10. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ТРЕС И КРЕС В ДИНАМИКЕ У ПАЦИЕНТА СР С Х-СЦЕПЛЕННОЙ АГАММАГЛОБУЛИНЕМИЕЙ

Дата забора крови	Возраст, лет	ТРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов	КРЕС на 10 ⁵ лейкоцитов
21.03.2013	12,7	4,85 × 10 ⁴	не обнаружено
12.11.2013	13,4	3,22 × 10 ⁴	не обнаружено
09.07.2014	14,0	1,75 × 10 ⁴	не обнаружено

что в абсолютном количестве составило 85 клеток на мкл. Из всех образцов ТКИН, у которых отсутствовали Т-хелперы, этот имел самое высокое их количество. В любом случае, выявленные в образце единичные копии TREC позволяли заподозрить серьезный дефицит Т-лимфоцитов у данного пациента. Таким образом, для мишени TREC в случае пациентов с диагнозом ПИД, ТКИН диагностическая чувствительность системы составила 100%. Из группы пациентов с ТКИН двое практически не имели В-лимфоцитов (0,5% и 3%) и имели фенотип CD8-V-NK⁺ и Т-V-NK⁺ соответственно. В первом случае результаты амплификации по мишени KREC были отрицательными, а во втором были обнаружены KREC в количестве в 100 раз меньше нижней границы нормы — $1,07 \times 10^1$ копий/ 10^5 клеток при норме $1,0 \times 10^3$ — $1,0 \times 10^5$ копий/ 10^5 клеток.

Анализ количества TREC и KREC в образцах цельной крови от 7-ми детей с X-сцепленной агаммаглобулинемией подтвердил высокую диагностическую чувствительность системы для мишени KREC: ни в одном из случаев не было обнаружено неспецифического сигнала. Во всех случаях результат амплификации по мишени KREC был отрицательным, что полностью согласуется с результатами иммунофенотипирования и клиническими данными. В связи с тем, что мутация в гене ВТК блокирует дифференцировку В-лимфоцитов до этапа созревания функционального В-клеточного рецептора, результаты количественной ПЦР соответствуют ожидаемым. От двух пациентов с X-сцепленной агаммаглобулинемией образцы крови были получены в динамике: 6 образцов за период с 2012 по 2015 год от пациента ШД и 3 образца за 2013-2014 года от пациента СР (табл. 9 и 10). Рутинно проведенное иммунофенотипирование подтвердило отсутствие В-лимфоцитов в периферической крови во всех взятых в динамике образцах, при этом остальные показатели иммунного статуса изменялись согласно возрасту пациентов. Результат количественной ПЦР также во всех случаях не выявил молекул KREC вне зависимости от возраста пациента и даты взятия материала. Таким образом, на коллекционных образцах крови от пациентов с диагнозами ТКИН и X-сцепленная агаммаглобулинемия было показано, что предложенная система обладает высокой диагностической чувствительно-

стью как для мишени TREC, так и для мишени KREC.

Обсуждение

Целью нашей работы являлась разработка простого и производительного метода количественного анализа молекул ДНК TREC и KREC в образцах цельной крови человека и в сухих пятнах. Для этого нами была использована мультиплексная количественная ПЦР в режиме реального времени, в которой для нормировки количества TREC и KREC использовано измерение количества взятых в реакцию геном-эквивалентов ядродержащих клеток за счет измерения количества инвариантного локуса в гене IL17RA. Это также позволяет контролировать этапы экстракции ДНК и проведения ПЦР, отсутствие в образце ингибиторов ПЦР, оценивать адекватность взятия и количество материала.

Использование предложенной системы снижает стоимость анализа за счет мультиплексирования, а стандартизация методики уменьшает время получения результата. Данная методика может быть применима для потокового скрининга большого числа образцов одновременно.

Анализ может быть проведен как с использованием цельной крови, так и с ДНК, полученной из сухих пятен крови, собираемых в ходе национальной программы скрининга новорожденных. В результате амплификации в присутствии калибраторов и количественного подсчета копий TREC и KREC можно отличить Т- и В-клеточные лимфопении у пациентов с ТКИН и агаммаглобулинемией от здоровых новорожденных. Однако низкое число копий TREC и KREC также может быть результатом других иммунодефицитных заболеваний, таких как синдром DiGeorge, либо объясняться применением иммуносупрессивной терапии или незрелостью иммунной системы в случае недоношенных детей. Во всех случаях требуются подтверждающие тесты, а результат оценки копий TREC и KREC используется в комплексной диагностике описанных состояний.

Нормализованные значения TREC и KREC не имели статистически значимых различий по отношению к полу, что соответствует результатам, полученным и опубликованным другими исследователями [11, 14, 15]. Надо отметить, что полученные в нашей пилотной работе возраст-

ные нормы TREC и KREC требуют дальнейшего уточнения. В особенности этому должно быть уделено отдельное внимание при выборе метода выделения ДНК из образцов крови или су-ших пятен. Например, нами показано (данные не приведены), что нормированные значения TREC и KREC могут отличаться при использовании методов ДНК, основанных на различных физико-химических принципах: преципитации суммарной ДНК спиртами или ее селективной сорбции на силикагеле в растворах хаотропных солей.

Разработанная тест-система может быть использована для решения других клинических задач, в которых затрагиваются механизмы генерации наивных Т- и В- лимфоцитов (см. табл. 6). Однако требуется более тщательное исследование диагностических характеристик предложенной системы на выборках большего объема, в том

числе и для определения более четких границ нормальных значений TREC и KREC в зависимости от возраста.

Выводы

1. Нами разработана тест-система на основе количественной ПЦР в режиме реального времени для скрининга первичных иммунодефицитов у детей:

Чувствительность: 5×10^3 TREC/KREC на мл, специфичность: 100%.

2. Установлены границы нормы по содержанию TREC и KREC у условно здоровых детей.

3. Показана возможность применения данной системы в случае детей с ТКИН и X-сцепленной агаммаглобулинемией и конкордантность результатов метода «золотого стандарта» – иммунного статуса и предлагаемой тест-системы.

Список литературы / References

1. Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J. VDJ recombination. *Immunology Today*, 1992, Vol. 11, no. 8, pp. 306-214.
2. Blackwell T.K., Alt F.W. Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annual Review of Genetics*, 1989, Vol. 23, pp. 605-636.
3. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature*, 1998, Vol. 17, no. 39, pp. 690-695.
4. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature*, 1983, Vol. 302, pp. 575-581.
5. van der Burg M., Tümkaya T., Boerma M., de Bruin-Versteeg S., Langerak A.W., van Dongen J.J. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood*, 2001, Vol. 97, pp. 1001-1008.
6. van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M., van Dongen J.J. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *The Journal of Experimental Medicine*, 2007, Vol. 204, pp. 645-655.
7. Amariglio N., Lev A., Simon A., Rosenthal E., Spirer Z., Efrati O., Broides A., Rechavi G., Somech R. Molecular assessment of thymus capabilities in the evaluation of T-cell immunodeficiency. *Pediatric Research*, 2010, Vol. 67, no. 2, pp. 211-216.
8. Puck J.M., SCID Newborn Screening Working Group. Population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency: steps toward implementation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2007, Vol. 120, no. 4, pp. 760-768.
9. Roifman C.M., Somech R., Grunebaum E. Matched unrelated bone marrow transplant for T⁺ combined immunodeficiency. *Bone Marrow Transplantation*, 2008, Vol. 41, pp. 947-952.
10. Baker M.W., Grossman W.J., Laessig R.H., Hoffman G.L., Brokopp C.D., Kurtz D.F., Cogley M.F., Litsheim T.J., Katcher M.L., Routes J.M. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2009, Vol. 124, no. 3, pp. 522-527.
11. Sottini A., Ghidini C., Zanotti C., Chiarini M., Caimi L., Lanfranchi A., Moratto D., Porta F., Imberti L. Simultaneous quantification of recent thymic T-cell and bone marrow B-cell emigrants in patients with primary immunodeficiency undergone to stem cell transplantation. *Clinical Immunology*, 2010, Vol. 136, no 2, pp. 217-227.
12. Borte S., von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J., Sack U., Pan-Hammarström Q., Borte M., Hammarström L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood*, 2012, Vol. 119, no 11, pp. 2552-2555.

13. Lang P.O., Govind S., Dramé M., Aspinall R. Comparison of manual and automated DNA purification for measuring TREC in dried blood spot (DBS) samples with qPCR. *Journal of Immunological Methods*, 2012, Vol. 384, no. 1-2, pp. 118-127.
14. Ou X., Zhao H., Sun H., Yang Z., Xie B., Shi Y., Wu X. Detection and quantification of the age-related sjTREC decline in human peripheral blood. *International Journal of Legal Medicine*, 2011, Vol. 125, pp. 603-608.
15. Ou X.L., Gao J., Wang H., Wang H.S., Lu H.L., Sun H.Y. Predicting human age with bloodstains by sjTREC quantification. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 8, p. e42412.

Авторы:

Гордукова М.А. — биолог клинической диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Оскорбин И.П. — аспирант кафедры молекулярной биологии, Новосибирский государственный исследовательский университет, г. Новосибирск, Россия

Мишукова О.В. — младший научный сотрудник лаборатории фармакогеномики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, Россия

Зимин С.Б. — заведующий отделением иммунопатологии ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Зиновьева Н.В. — к.м.н., заведующая отделением аллергологии и иммунологии КДП ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Давыдова Н.В. — к.м.н., врач клинической диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Смирнова А.С. — врач клинической диагностической лаборатории ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Никитина И.А. — заведующая учебной лабораторией кафедры факультетской педиатрии № 2 педиатрического факультета РНИМУ им. Пирогова на базе ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Корсунский И.А. — к.м.н., заведующий московским городским центром детской иммунологии и аллергологии, ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Филипенко М.Л. — к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики, Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН; заведующий лабораторией палеогенетики, Новосибирский государственный исследовательский университет, г. Новосибирск, Россия

Продеус А.П. — д.м.н., профессор, заместитель главного врача по инфекционным болезням ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского» ДЗ Москвы, Москва, Россия

Authors:

Gordukova M.A., Biologist, Clinical Diagnostic Laboratory, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Oskorbin I.P., Graduate Student, Department of Molecular Biology, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Mishukova O.V., Junior Research Associate, Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation

Zimin S.B., Head, Department of Immunopathology, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Zinovieva N.V., PhD (Medicine), Head, Allergy and Immunology Department, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Davydova N.V., PhD (Medicine), Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Smirnova A.S., Doctor, Clinical Diagnostic Laboratory, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Nikitina I.A., Head, Training Laboratory of Faculty of Pediatrics № 2 of Pirogov Russian National Research Medical University, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Korsunsky I.A., PhD (Medicine), Head, Moscow City Center for Pediatric Immunology and Allergy, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Filipenko M.L., PhD (Biology), Head, Pharmacogenomics Laboratory, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Head, Paleogenetics Laboratory, Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russian Federation

Prodeus A.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Chief of Infectious Diseases, G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.06.2015
Отправлена на доработку 29.06.2015
Принята к печати 06.07.2015

Received 12.06.2015
Revision received 29.06.2015
Accepted 06.07.2015

НОВЫЙ МЕТОД ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ СИСТЕМЫ КОМПЛЕМЕНТА

Черемных Е.Г.¹, Иванов П.А.¹, Фактор М.И.¹, Карпова Н.С.¹,
Васильева Е.Ф.¹, Гусев К.В.², Брусов О.С.¹

¹ ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

² ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Резюме. Система комплемента является важным компонентом врожденного иммунитета, обеспечивающим первичную защиту против проникающих в организм патогенов. Кроме того, показано, что система комплемента связана со многими заболеваниями, не только аутоиммунными и инфекционными, но и психическими. В связи с этим необходима разработка доступного и быстрого метода определения активности системы комплемента в режиме реального времени.

Представлен новый автоматизированный метод оценки функциональной активности системы комплемента (СК), основанный на цитолитическом действии этой системы для инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Метод состоит в циклическом подсчете живых подвижных клеток с помощью разработанного нами прибора БиоЛаТ, в состав которого входят две видеокамеры, устройства подсветки и перемещения круглого планшета, планшет с двумя рядами лунок, микропроцессорный блок управления. Управляет работой прибора и осуществляет подсчет клеток программа AutoCiliata. Подсчет производится на основе последовательной фиксации двух кадров с дальнейшей программной обработкой изображений.

Представлены результаты микроскопических наблюдений процесса гибели клетки в буфере на основе триэтаноламина с 5% концентрацией сыворотки крови, а также результаты сравнения активности СК в различных буферах — среде культивирования инфузорий, веронал-мединаловом буфере и буфере на основе триэтаноламина (ТЭА). Обоснована замена веронал-мединалового буфера на буфер на основе триэтаноламина.

Время гибели всех клеток в буфере на основе триэтаноламина с концентрацией сыворотки 5% не превышает 15 минут для всех исследованных сывороток. В качестве величин, характеризующих активность СК, выбраны время гибели половины клеток ($T_{\text{лд50}}$) и величина $100 \times (1/T_{\text{лд50}})\%$ (активность системы комплемента, АСК).

Представлены результаты оценки чувствительности метода, на основе зависимостей $T_{\text{лд50}}$ и АСК от концентрации сыворотки. Выдвинуто предположение о возможности оценки интегральной активности комплемента и соотношения интенсивностей синтеза и расхода его эффекторных белков.

Отражены результаты исследования разного содержания ионов Ca^{++} и Mg^{++} в буфере и обоснован выбор их физиологических концентраций, 2,5 мМ и 1,5 мМ соответственно.

Оценены статистические характеристики точности аппаратной и методической частей метода, средние коэффициенты вариации составляют 3,9 и 2,7% соответственно, что удовлетворяет требо-

Адрес для переписки:

Карпова Наталья Сергеевна
ФГБНУ «Научный центр психического здоровья»
115522, Россия, Москва, Каширское шоссе, 34.
Тел.: 8 (495) 952-91-41.
E-mail: nat_karpova@mail.ru

Address for correspondence:

Karpova Natalia S.
Research Center of Mental Health
115522, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye ch., 34.
Phone: 7 (495) 952-91-41.
E-mail: nat_karpova@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Г. Черемных, П.А. Иванов, М.И. Фактор, Н.С. Карпова, Е.Ф. Васильева, К.В. Гусев, О.С. Брусов, «Новый метод оценки функциональной активности системы комплемента» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 479-488. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488

© Черемных Е.Г. и соавт., 2015

For citation:

E.G. Cheremnykh, P.A. Ivanov, M.I. Faktor, N.S. Karpova, E.F. Vasiljeva, K.V. Gusev, O.S. Brusov, "A new method to assess functional activity of serum complement system", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 479-488. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-479-488

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-479-488>

ваниям надежности результатов исследования, а короткое время исследования доказывает возможность применения метода в клинической практике в онлайн-режиме.

Разработан метод полуавтоматического определения функциональной активности сывороточного компонента, который может быть использован в повседневной клинической практике, том числе в онлайн-режиме.

Ключевые слова: система компонента, активность компонента, *Tetrahymena pyriformis*, прибор БиоЛат, обработка изображения, подсчет клеток

A NEW METHOD TO ASSESS FUNCTIONAL ACTIVITY OF SERUM COMPLEMENT SYSTEM

Cheremnykh E.G.^a, Ivanov P.A.^a, Faktor M.I.^a, Karpova N.S.^a,
Vasiljeva E.F.^a, Gusev K.V.^b, Brusov O.S.^a

^a Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

^b N.A. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital № 1, Moscow Department of Health Care, Moscow, Russian Federation

Abstract. Complement system is an important component of innate immunity, providing primary protection against pathogens invading the body. In addition, it was shown that the complement system is associated with many diseases, not only autoimmune and infectious, but also mental disorders. In this regard, it is necessary to develop affordable and fast method of measuring activity of the complement system in real-time mode.

We present a new semi-automated method for assessment of serum complement activity. The assay is based on cytolytic action of complement system upon the ciliate organism *Tetrahymena pyriformis*. This method consists in repeated counting of live *Tetrahymena* motile cells by means of specially developed Biolat device, which consists of two video cameras, light sources, and movable round plate. The plate has two rows of holes. The device also includes microprocessor control unit based on AutoCiliata software, intended for control of operation module and counting the surviving cell. The calculations are based on fixation of two sequential video-frames, with subsequent software image processing.

Cell death events were observed upon incubation in triethanolamine (TEA) buffer containing 5% of blood serum. We have also compared complement activity in different buffers, i.e., standard medium for culturing of ciliates, Veronal-Medinalum buffer, and the TEA buffer. TEA buffer was found superior to the Veronal buffer when applied in the test system. The time of cell death in the TEA-buffered medium containing 5% serum was < 15 minutes for all the sera studied. The parameters denoting serum complement activity were as follows: a half-life time for the moving cells (T_{LD50}), and a similar value for 100% cell inactivation ($1/T_{LD50}$, functional activity of the complement system, ACS). The sensitivity of this assay was calculated from dependencies between T_{LD50} and ACS, and actual serum concentrations. We have suggested an opportunity for evaluation of an integral complement activity, and interrelations between the intensity of synthesis and consumption of its major effector proteins. In the course of this study, we have tested different concentrations of Ca^{++} and Mg^{++} ions in the incubation buffer, with optimal physiological concentrations of 2.5 mM and 1.5 mM, respectively. We have also estimated statistical precision characteristics for pre-analytical and analytical steps of the method. The average coefficients of variation (CV) were 3.9% and 2.7%, respectively, thus satisfying the reliability criteria in research. A short performance time of the study suggests its potential application in clinical practice, including online examination regimens.

A method for semi-automatic measurement of serum complement activity could be applicable in daily clinical practice, including the online performance.

Keywords: complement system, complement activity, *Tetrahymena pyriformis*, BioLat device, image processing, cell counts

Введение

Система компонента (СК), самая древняя составляющая иммунитета, имеет важнейшее значение в защите организма человека и животных, но эта система часто бывает одним из зна-

чимых факторов неблагоприятного прогноза при многих заболеваниях, не только аутоиммунных или инфекционных. В настоящее время установлена связь системы компонента и усиления патологического процесса при тяжелых травмах [5], болезнях сердца [11] и почек [12], рассеян-

ном склерозе [8], посттравматическом стрессе [3] психических заболеваниях, таких как депрессия [14], болезнь Альцгеймера [9], шизофрения [15], расстройства аутистического спектра [10] и др. Также установлено, что система комплемента является перспективной терапевтической мишенью [7], а умеренное и своевременное ее ингибирование облегчает течение болезни и улучшает прогноз [6]. Поскольку система комплемента выполняет жизненно важную функцию для организма, то терапевтическое воздействие на эту систему должно обязательно контролироваться в режиме реального времени.

Сегодня активность комплемента в целом, отдельных путей или отдельных компонентов оценивают по степени гемолиза эритроцитов барана [2] и с помощью иммуноферментного метода [4]. Эти методы не позволяют оценивать уровень активности СК в режиме реального времени, а себестоимость иммуноферментных диагностических систем делает их недоступными для широкого применения сегодня. Кроме того, гемолитический метод часто дает ложноположительные результаты из-за реактивного лизиса [1], что снижает его достоверность.

Поэтому разработка быстрого, технологичного и дешевого метода интегральной оценки функциональной активности комплемента, не дающего реактивного лизиса, актуальна и, возможно, будет востребована медицинской практикой.

Материалы и методы

Объектом исследования является сыворотка венозной крови здоровых доноров. Сыворотку получали из крови сразу после отбора, замораживали при температуре $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ и использовали для исследования в течение 7 дней.

Разрабатываемый метод оценки активности системы комплемента основан на действии СК на простейших *Tetrahymena pyriformis* и регулярном циклическом подсчете их количества в пробах с сывороткой до полной гибели простейших.

Штамм инфузорий WH14 был любезно предоставлен профессором Долговым В.А. (Всероссийский научно-исследовательский институт ветеринарной санитарии гигиены и экологии). Культивировали инфузории при стабильной температуре $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ на стерильной 4-компонентной среде: 0,5% пептон, 0,5% глюкоза, 0,1% дрожжевой экстракт, 0,1% хлористый натрий (все реактивы фирмы Sigma). На четвертые сутки после

пересева на свежую среду инфузорий использовали в опытах.

Для микроскопических наблюдений использовался микроскоп Imager M1 Carl Zeiss с объективами 10x и 40x, оборудованный камерой AxioCam HRc.

Регулярный подсчет живых подвижных клеток простейших осуществляли с помощью разработанных нами прибора БиоЛаТ-3 (рис. 1) и управляющей программы AutoCiliata (рис. 2). Прибор выполнен в цилиндрическом корпусе, в его состав входят следующие узлы:

- 2 видеокамеры с объективами;
- 2 устройства подсветки;
- устройство перемещения круглого планшета;
- планшет с двумя рядами лунок;
- микропроцессорный блок управления камерами и перемещением планшета.

В опыте лунки последовательно позиционируются под объективы видеокамер для подсчета в них живых клеток. Подсчет в каждой лунке производится на основе последовательной фиксации двух кадров каждой лунки и дальнейшей программной обработки изображений результатов вычитания, отражающих информацию только о подвижных объектах. Обработка состоит в выявлении и подсчете всех объектов заданной площади. Подсчет осуществляется до полной гибели инфузорий во всех заданных лунках. Далее программа рассчитывает время гибели половины от начального количества клеток ($T_{\text{лд}50}$) и величину активности системы комплемента – $\text{АСК} = 100 \times (1/T_{\text{лд}50})\%$. В режиме реального времени результаты подсчета каждой лунки отражаются на экране в виде графика изменения количества клеток (рис. 2). Процесс, отражаемый



Рисунок 1. Прибор БиоЛаТ-3

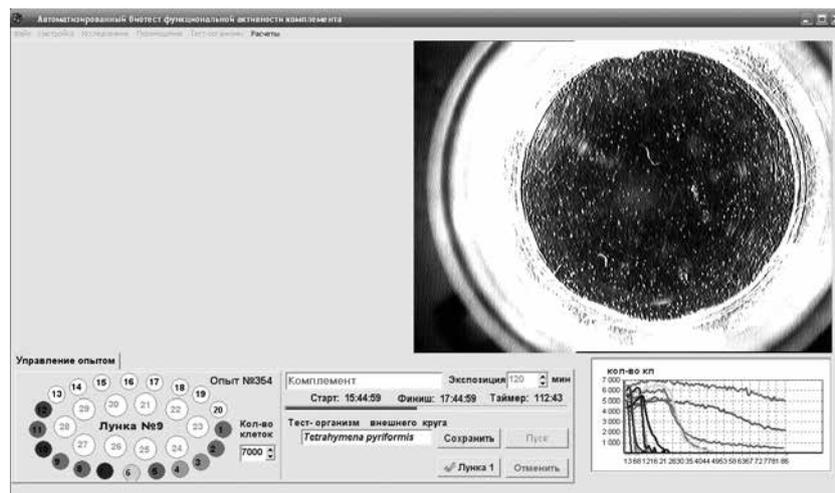


Рисунок 2. Основной интерфейс программы AutoCiliata, предназначенной для подсчета живых подвижных объектов

графиком, имеет 3 фазы: лаг-фаза — количество клеток почти не меняется, фаза быстрой гибели клеток и фаза стабильного остаточного количества клеток. Через 2 часа результаты и рассчитанные параметры комплемента сохраняются в файле Excel. Если во всех лунках произошла полная гибель клеток раньше чем за 2 часа, то все можно сохранить, при включении соответствующей команды.

Исследования проводили при стабильной температуре 25 °С в трех разных буферах:

1. Среда культивирования инфузорий.

2. Веронал-мединаловый буфер (ВБС⁺⁺) с рН 7,5: 0,78 мМ веронала, 0,73 мМ мединала, 0,73 мМ NaCl 2,5 мМ Mg⁺⁺, 0,75 мМ Ca⁺⁺ (MgCl₂, CaCl₂); обычно используется для оценки активности комплемента по гемолизу эритроцитов.

3. Буфер на основе триэтаноламина (ТЭА⁺⁺) с рН 7,5: 1 мМ ТЭА и несколько вариантов концентраций (0-10 мМ) Ca⁺⁺ и Mg⁺⁺.

Все реактивы фирмы Sigma.

Результаты

1. Визуальное наблюдение гибели *Tetrahymena pyriformis*

При наблюдении за состоянием клеток *Tetrahymena pyriformis* с помощью оптического микроскопа установлена их гибель через 5-7 минут после добавления сыворотки в концентрации 5%, и уже через 15 минут живых клеток не остается. Процесс гибели индивидуальной клетки занимает около одной минуты и сопровождается выраженными изменениями морфологии клетки. На рисунке 3 представлены изображения

индивидуальной клетки в процессе гибели, полученные с интервалом в 20 секунд.

Время гибели всех клеток в буфере на основе триэтаноламина с концентрацией сыворотки 5% не превышает 15 минут для всех исследованных сывороток. В качестве величин, характеризующих активность СК, выбраны время гибели половины клеток (Т_{лд50}) и величина, равная 100 (1/Т_{лд50})% (активность системы комплемента, АСК).

2. Сравнение действия сыворотки крови здоровых доноров на инфузории *Tetrahymena pyriformis* в трех разных буферах: среда культивирования инфузорий, ВБС⁺⁺, ТЭА⁺⁺

2.1. Сравнение действия сыворотки в среде культивирования и буфере ТЭА⁺⁺

Общий объем в каждой лунке — 300 мкл. Для получения разных концентраций сыворотки в среде культивирования в лунки 1-3 планшета прибора БиоЛаТ ввели по 270 мкл среды культивирования и по 15 мкл сыворотки (концентрация сыворотки 5%), 4-6 — 255 мкл среды и 30 мкл сыворотки (концентрация сыворотки 10%), 7-9 — 225 мкл среды и 60 мкл сыворотки (концентрация сыворотки 20%). В лунки 10-12 ввели 270 мкл буфера ТЭА⁺⁺ и 15 мкл сыворотки.

После включения прибора ввели в каждую лунку по 15 мкл среды с инфузориями и запустили процесс циклического подсчета клеток в 12 лунках с помощью команды «Комплемент» программы AutoCiliata.

При разведении сыворотки средой в 5 раз АСК = 21,98 и Т_{лд50} = 4,55, в 10 раз — АСК = 10,6 Т_{лд50} = 9,43, в 20 раз — АСК = 3,39 Т_{лд50} = 29,49, в буфере ТЭА⁺⁺ с 2,5 мМ Ca⁺², 1,5 мМ Mg⁺², при

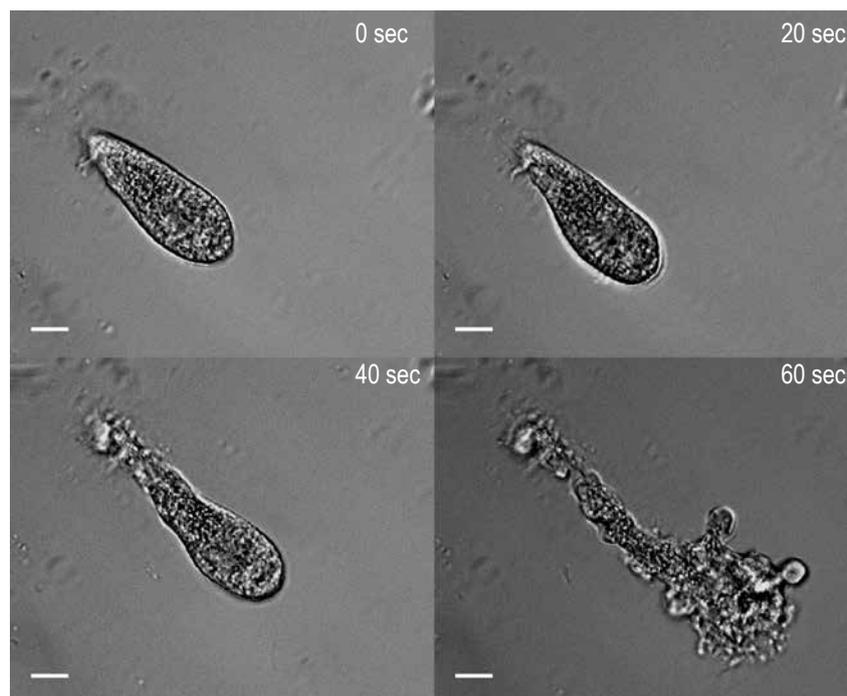


Рисунок 3. Гибель клетки *Tetrahymena pyriformis* при активации СК

20-кратном разведении сыворотки АСК = 21,32
 $T_{LD50} = 4,69$.

Таким образом, в буфере ТЭА⁺⁺ с физиологическими концентрациями ионов кальция и магния активность комплемента в 4 раза выше, чем в среде культивирования.

2.2. Сравнение действия сыворотки в буферах ВБС⁺⁺ и ТЭА⁺⁺

Буфер в системе «сыворотка крови – инфузории» нужен, во-первых, для обеспечения постоянной величины рН = 7,5, во-вторых, для обеспечения необходимых для активации СК концентраций ионов Ca⁺² и Mg⁺². В состав веронал-мединалового буфера входят наркотологические препараты, следовательно, сейчас они стали недоступны, поэтому было решено использовать буфер на основе триэтаноламина с физиологическими концентрациями ионов кальция и магния.

Этот буфер (1 мМ ТЭА, 2,5 мМ Ca⁺², 1,5 мМ Mg⁺², рН 7,5) оценили на токсичность. Выживаемость простейших через 24 часа составляет 100%. Это означает, что в выбранных концентрациях триэтаноламина и солей буфер нетоксичен для инфузорий *Tetrahymena pyriformis*.

Для сравнения активности СК в 2-х буферах использовали 12 сывороток крови здоровых доноров. В каждую из 12 лунок планшета ввели 270 мкл буфера, 15 мкл одной из 12 сывороток и 15 мкл среды с инфузориями. Опыт повторен дважды с двумя разными буферами.

Результаты сравнения активности СК для 12 сывороток в буферах ВБС⁺⁺ и ТЭА⁺⁺ представлены в таблице 1. Коэффициент корреляции по 12 сывороткам для АСК в 2-х буферах составляет 0,8506.

2.3. Активность системы комплемента при разных концентрациях ионов Ca⁺² и Mg⁺²

Концентрации ионов Ca⁺² и Mg⁺², а также Na⁺ в веронал-мединаловом буфере, применяемом в методе оценки активности комплемента по гемолизу эритроцитов, вероятно, определены в соответствии с особенностями тест-объектов (эритроцитов), в литературных данных обоснования солевого состава ВБС⁺⁺ не найдено. Поскольку в разрабатываемом методе используется другой тест-объект, то концентрации солей необходимо выбирать, руководствуясь только особенностями системы комплемента, т.к. инфузории нормально функционируют в широком диапазоне концентраций солей, и оптимальный рН для этих простейших около 7.

Физиологическими значениями в крови концентраций Ca⁺² и Mg⁺² являются 2,5 мМ и 1,5 мМ соответственно. Поэтому для исследования влияния этих ионов на активность комплемента был выбран диапазон концентраций от 0 до 10 мМ. Изменение активности системы комплемента в зависимости от концентраций Ca⁺² и Mg⁺² представлено на графиках рисунков 4, 5.

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ СК В ДВУХ БУФЕРАХ ВБС⁺⁺ И ТЭА⁺⁺

№ сыворотки	Тлд50 (ВБС ⁺⁺), мин	АКС (ВБС ⁺⁺)	Тлд50 (ТЭА ⁺⁺), мин	АКС(ТЭА ⁺⁺)
1	6,4	15,625	6,45	15,50387597
2	6,9	14,49275362	6,9	14,49275362
3	9,3	10,75268817	9,5	10,52631579
4	6,9	14,49275362	6,9	14,49275362
5	6,9	14,49275362	6,9	14,49275362
6	7,3	13,69863014	8,1	12,34567901
7	6,3	15,87301587	8,1	12,34567901
8	6,5	15,38461538	6,9	14,49275362
9	8,7	11,49425287	8,9	11,23595506
10	8,5	11,76470588	8,9	11,23595506
11	9,4	10,63829787	9,4	10,63829787
12	7,15	13,98601399	7,6	13,15789474
	коэф. корреляции	0,850621357		

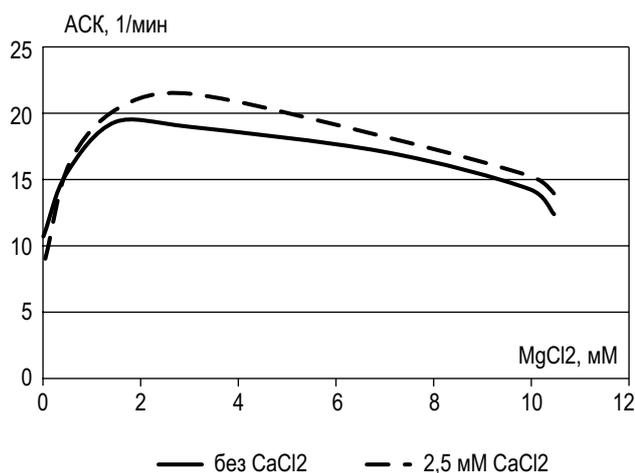


Рисунок 4. Изменение активности комплемента в зависимости от концентрации Mg²⁺ в буфере

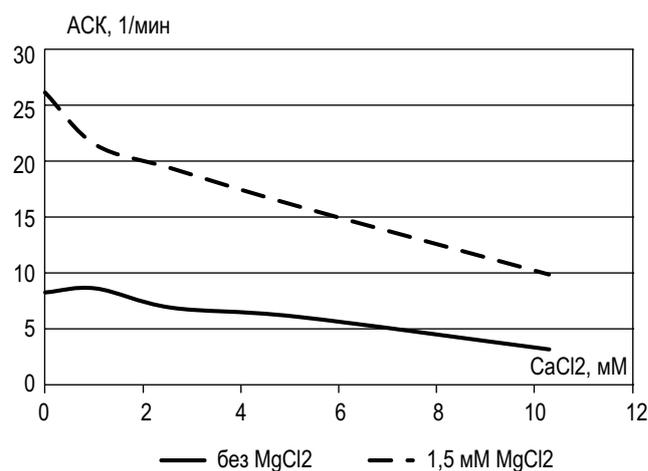


Рисунок 5. Изменение активности комплемента в зависимости от концентрации Ca²⁺ в буфере

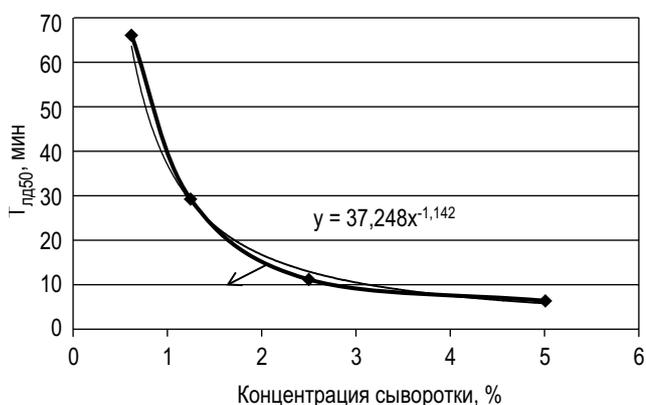


Рисунок 6. Зависимость изменений параметров (1 – Тлд₅₀, 2 – АСК) активности СК от концентрации сыворотки

3. Чувствительность метода

Чувствительность метода определяли с помощью изучения $T_{\text{лд50}}$ и АСК для разных концентраций сыворотки – 5, 2,5, 1,25 и 0,625%. Этот диапазон концентраций сыворотки выбран исходя из результатов многократных различных сывороток здоровых людей. При концентрации сыворотки выше 5% гибель простейших может происходить слишком быстро (< 1 минуты) и точность метода снижается, а при концентрации ниже 0,5% часто невозможно определить АСК, т.к. гибели инфузорий не происходит.

Результат оценки $T_{\text{лд50}}$ и АСК для концентраций сыворотки – 5, 2,5, 1,25 и 0,625% – представлен на графиках рисунка 6.

4. Статистические характеристики метода

Оценку точности подсчета живых клеток на приборе БиоЛаТ проводили с помощью режима программы AutoCiliata «Экспресс-тест», который заключается в многократном подсчете клеток в заданных лунках. Подсчет производили в 10 лунках 10 раз. Результат подсчета представлен в таблице 2. Коэффициент вариации по всем лункам не превышает 5%, а средний коэффициент вариации равен 3,9%

Результат оценки одной и той же сыворотки в разное время представлен на графиках рисунка 7.

Обсуждение

Цитолитическое действие сыворотки крови для инфузорий замечено давно, а предположение о том, что гибель простейших происходит в результате активации системы комплемента, было

высказано уже в 1958 году [13]. Проблема использования этих тест-объектов для оценки комплемента состояла в вариабельности чувствительности культур и невозможности количественной оценки результата. При культивировании инфузорий в описанных условиях и использовании их в опыте всегда в одной фазе роста культуры (на 4 сутки) задача стабилизации чувствительности решена, что доказано в испытаниях одной и той же сыворотки в периоде 2-х недель. Точность подсчета живых подвижных клеток с помощью прибора БиоЛаТ показана в таблице 2. Коэффициенты вариации не превышают 5%. Таким образом, инструментальная составляющая разрабатываемого метода удовлетворяет требованиям по надежности и достоверности результатов.

При микроскопическом наблюдении за состоянием клетки *Tetrahymena pyriformis* в буфере ТЭА⁺⁺ с концентрацией сыворотки 5% был зафиксирован процесс ее гибели, представленный на рисунке 3 последовательностью кадров. Целостность клетки нарушается из-за сквозных отверстий в районе клеточного рта, где клеточная мембрана наиболее тонка, и мембрано-атакующие комплексы, образующиеся в результате активации СК, быстро меняют осмотическое давление клетки. При этом содержимое клетки вытекает наружу. Это наблюдение, а также ряд исследований, касающихся действия на СК известных ингибиторов сериновых протеаз и не вошедших в настоящую статью, доказывают утверждение о том, что гибель простейших происходит в результате активации комплемента сыворотки крови.

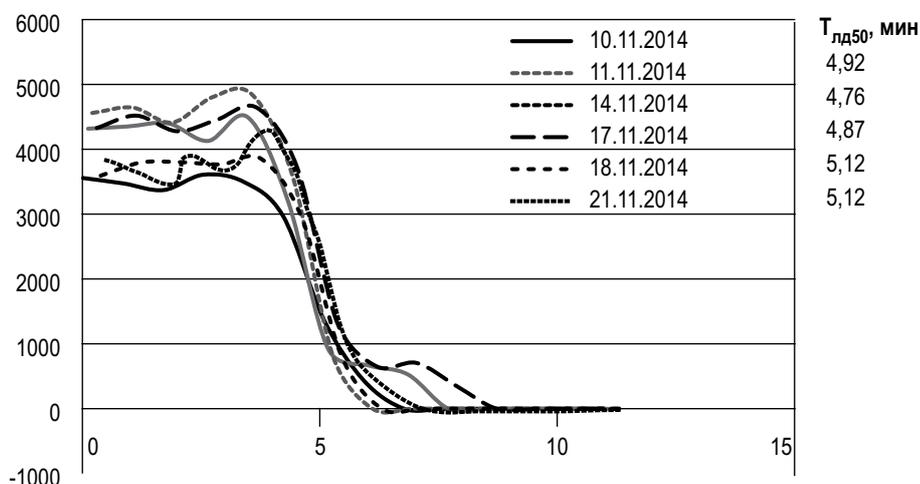


Рисунок 7. Оценка активности СК сыворотки в разное время. Средний коэффициент вариации для $T_{\text{лд50}}$ равен 2,7%.

ТАБЛИЦА 2. ОЦЕНКА ТОЧНОСТИ ПОДСЧЕТА ЖИВЫХ ПОДВИЖНЫХ ОБЪЕКТОВ С ПОМОЩЬЮ ПРИБОРА БиоПат

№ лун./ № подсчета	1	2	4	5	6	7	8	9	10
1	5401	5992	4925	5041	5667	5866	4894	5971	5274
2	5514	6124	4985	5279	5942	6095	5146	6127	5214
3	5314	6156	5251	5406	5899	6174	4899	6148	4871
4	5108	5415	4766	4967	5797	5936	4836	6343	5117
5	5075	5542	4817	5250	5742	6055	4835	6041	4763
6	4938	5804	4802	5137	5400	6083	4810	6035	4954
7	5060	5716	4594	4937	5463	5698	4660	5900	4866
8	4910	5715	4611	4809	5533	5679	4643	5993	4896
9	4847	5572	4690	4797	5329	5588	4779	5837	4617
10	5075	5454	4640	4782	5406	5759	4770	5651	4862
среднее	5124,2	5749	4808,1	5040,5	5617,8	5893,3	4827,2	6004,6	4943,4
ср. кв. отклонение	218,89	267,36	202,73	220,98	221,36	205,34	141,09	187,86	203,29
коэф. вариации	4,27	4,65	4,22	4,38	3,94	3,48	2,92	3,13	4,11

Изменение активности СК в зависимости от концентраций ионов магния и кальция (рис. 4, 5) отражает особенности механизма СК. Для ионов магния существует максимум при 3 мМ в условиях содержания кальция (0,125 мМ содержится при разведении сыворотки в 20 раз) и при 1,5 мМ в условии 2,5 мМ (в буфере) + 0,125 мМ (в сыворотке). При концентрациях магния от минимальной (0,075 мМ) до 1,5 или 3 мМ активность СК резко возрастает, что говорит о возрастании доли в активности СК петли амплификации в альтернативном пути, имеющего магний-зависимые ферменты. Активность СК при содержании магния от 1,5 или 3 мМ до 10 мМ медленно убывает, а при концентрации выше 10 мМ резко падает. Вероятно, высокие концентрации магния ингибируют СК, замещая ионы кальция в кальций-зависимых ферментах классического и лектинового путей.

Характер зависимости АСК от концентрации ионов кальция иной. График монотонно увеличивается при увеличении концентрации кальция, при этом АСК в буфере с 1,5 мМ ионов магния существенно выше, чем в буфере без магния. Монотонное увеличение АСК можно объяснить наличием в СК кальций-зависимых эффекторов и ингибиторов, на роль последнего может претендовать фактор I, являющийся сериновой про-

теазой. Почти линейная зависимость объясняется тем, что функции активации и ингибирования в СК сбалансированы на одинаковом уровне общей активности эффекторов и ингибиторов. Увеличенный уровень АСК (пунктирная линия) при концентрации ионов магния 1,5 мМ свидетельствует о высоком вкладе магний-зависимой петли амплификации.

Зависимость $T_{лд50}$ от концентрации сыворотки является псевдогиперболической (рис. 6), т.к. хорошо аппроксимируется гиперболой в выбранном диапазоне концентраций, но при концентрации меньше 0,5% для большинства исследованных сывороток не происходит гибели инфузорий, т.е. в верхней части кривая имеет обрыв. В нижней части кривой (при увеличении концентрации выше 5%) значение $T_{лд50}$ очень быстро приближается к 0, и поэтому время $T_{лд50}$ невозможно оценить.

Зависимость величины АСК от концентрации исследованной сыворотки аппроксимирована квадратным уравнением ($АСК = -0,2755X^2 + 4,7935X - 1,6595$). Вычисленное значение концентрации сыворотки, при которой гибели инфузорий не происходит ($АСК = 0$), равно 0,35%. Для всех исследованных сывороток эта концентрация меньше 1,25% и является особенностью СК конкретного человека и/или особенностью

патологии. АСК₀ характеризует интенсивность синтеза эффекторов СК, т.е. количество активных ферментов, в результате действия которых формируется мембрано-атакующий комплекс (МАК).

Для концентраций сыворотки 5% и выше величина T_{лд50} отражает и собственно суммарную активность ферментной каскадной системы комплемента и количество активных молекул. Соотношение T_{лд50}(5%)/T_{лд50}(0,625%) может характеризовать степень истощения СК: чем больше эта величина, тем меньше эффекторных молекул СК в сыворотке и, соответственно, образуется меньше МАК. Таким образом, эта величина может

служить оценкой соотношения синтеза и расхода эффекторных молекул СК.

Статистические параметры (табл. 2, рис. 7) как аппаратной части, так и метода оценки активности СК удовлетворяют требованиям надежности результатов исследования, а короткое время исследования доказывает возможность применения метода в клинической практике в онлайн-режиме.

В заключение можно сказать, что вышеописанный метод по чувствительности, воспроизводимости, степени автоматизации его проведения и расчета может служить основой для использования его в широкой медицинской практике после его полной валидации и сертификации.

Список литературы / References

1. Кулешина О.Н., Андина С.С., Попова О.П., Черемных Е.Г., Козлов Л.В. Активность комплемента при коклюше // Эпидемиология и вакцинопрофилактика, 2013. Т. 2, № 69. С. 46-51. [Kuleshina O.N., Andina S.S., Popova O.P., Cheremnykh E.G., Kozlov, L.V. Activity of complement in pertussis]. *Epidemiologiya i vaksinoprofilaktika = Epidemiology and Vaccination*, 2013, Vol. 2, no. 69, pp. 46-51. (In Russ.)]
2. Кулешина О.Н., Козлов Л.В., Черемных Е.Г. Универсальный метод определения функциональной активности комплемента человека, лабораторных, домашних и сельскохозяйственных животных, земноводных и птиц // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2014. Т. 157, № 2. С. 254-257. [Kuleshina O.N., Kozlov L.V., Cheremnykh E.G. Universal method for determining the functional activity of the human complement, laboratory, domestic and farm animals, amphibians and birds]. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2014, Vol. 157, no. 2, pp. 254-257. (In Russ.)]
3. Оганесян Л.П., Мкртчян Г.М., Сукиасян С.Г., Амбарцумян М.К., Аветисян Г.В., Бояджян А.С. Комплемент как патогенный фактор при посттравматическом стрессе // Биологический журнал Армении, 2009. Т. 1, № 61. С. 48-53. [Oganesyanyan L.P., Mkrtychyan G.M., Sukiasyan S.G., Ambardzumyan M.K., Avetisyan G.V., Boyajyan A.S. Complement as a pathogenic factor in post-traumatic stress]. *Biologicheskii zhurnal Armenii = Biologist. Journal Armenia*, 2009, Vol. 1, no. 61, pp. 48-53. (In Russ.)]
4. Романов С.В., Козлов Л.В., Дьяков В.Л., Баталова Т.Н., Гузова В.А. Определение активности протеиназ системы комплемента иммуноферментными методами // Биомедицинская химия, 2003. Т. 49, № 6. С. 604-612. [Romanov S.C., Kozlov L.V., Dyakov V.L., Batalova T.N., Guzova V.A. Determination of the activity of proteases of the complement system immunoassay methods]. *Biomeditsinskaja himiya = Biomedical Chemistry*, 2003, Vol. 49, no. 6, pp. 604-612. (In Russ.)]
5. Bellander B.M., Singhrao S.K., Ohlsson M., Mattsson P., Svensson M. Complement activation in the human brain after traumatic head injury. *J. Neurotrauma*. 2001, Vol. 18, no. 12, pp. 1295-1311.
6. Ducruet A.F., Zacharia B.E., Sosunov S.A., Gigante P.R., Yeh M.L., Gorski J.W., Otten M.L., Hwang R.Y., DeRosa P.A., Hickman Z.L., Sergot P., Connolly E.S.Jr. Complement Inhibition Promotes Endogenous Neurogenesis and Sustained Anti-Inflammatory Neuroprotection following Reperfused Stroke. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 6, p. e38664.
7. Hillmen P. The role of complement inhibition in PNH. *American Society of Hematology*, 2008, Vol. 1, pp. 116-123.
8. Ingram G., Loveless S., Howell O.W., Hakobyan S., Dancey B., Harris C.L., Robertson N.P., Neal J.W., Morgan B.P. Complement activation in multiple sclerosis plaques: an immunohistochemical analysis. *Acta Neuropathol. Commun.*, 2014, Vol. 9, no. 2, p. 53.
9. Loeffler D.A., Camp D.M., Bennett D.A. Plaque complement activation and cognitive loss in Alzheimer's disease. *J. Neuroinflammation* 2008, Vol. 11, no. 5, p. 9.
10. Momeni N., Bergquist J., Brudin L., Behnia F., Sivberg B., Joghataei M.T., Persson B.L. A novel blood-based biomarker for detection of autism spectrum disorders. *Transl. Psychiatry*, 2012, Vol. 13, no. 2, p. e91.
11. Palikhe A., Sinisalo J., Seppänen M., Haario H., Meri S., Valtonen V., Nieminen M.S., Lokki M.L. Serum complement c3/c4 ratio, a novel marker for recurrent cardiovascular events. *Am. J. Cardiol.*, 2007, Vol. 1, no. 99 (7), pp. 890-895.

12. Roos A., Bouwman L.H., van Gijlswijk-Janssen D.J., Faber-Krol M.C., Stahl G.L., Daha M.R., Human IgA activates the complement system via the mannan-binding lectin pathway. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 1, no. 167 (5), pp. 2861-2868.
13. Sinclair I.J.B. The Role of Complement in the Immune Reactions of Paramecium aurelia and Tetrahymena pyriformis. *Immunology*, 1958, Vol. 1, no. 3, pp. 291-299.
14. Song C., Dinan T., Leonard B.E. Changes in immunoglobulin, complement and acute phase protein levels in the depressed patients and normal controls. *J. Affect. Disord.*, 1994, Vol. 30, no. 4, pp. 283-288.
15. Spivak B., Radwan M., Brandon J., Baruch Y., Stawski M., Tyano S., Weizman A. Reduced total complement haemolytic activity in schizophrenic patients. *Psychol. Med.*, 1993, Vol. 23, no. 2, pp. 315-318.

Авторы:

Черемных Е.Г. — к.т.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Иванов П.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Фактор М.И. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Карпова Н.С. — младший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Васильева Е.Ф. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория биохимии ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Гусев К.В. — врач клинической лабораторной диагностики ГБУЗ «Психиатрическая клиническая больница № 1 им. Н.А. Алексеева» Департамента здравоохранения города Москвы, Москва, Россия

Брусов О.С. — к.б.н., заведующий лабораторией биохимии, ФГБНУ «Научный центр психического здоровья», Москва, Россия

Authors:

Cheremnykh E.G., PhD (Technology), Senior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Ivanov P.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Faktor M.I., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Karpova N.S., Junior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Vasiljeva E.F., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Gusev K.V., Clinical Chemist (Laboratory Diagnostics), Clinical Laboratory, N.A. Alekseev Psychiatric Clinical Hospital № 1, Moscow, Russian Federation

Brusov O.S., PhD (Biology), Chief, Laboratory of Biochemistry, Research Center of Mental Health, Moscow, Russian Federation

Поступила 05.03.2015

Отправлена на доработку 11.03.2015

Принята к печати 06.04.2015

Received 05.03.2015

Revision received 11.03.2015

Accepted 06.04.2015

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 большем 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 содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка»)

6) Файл в формате .doc, .docx., ttf, 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://mimmmun.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

Аверина О.В.	443	Зиновьева Н.В.	467	Оскорбин И.П.	467
Балацкая Н.В.	461	Иванов П.А.	479	Продеус А.П.	467
Боголюбова А.В.	395	Камышный А.М.	455	Ратушный А.Ю.	443
Борисов А.Г.	431	Карпова Н.С.	479	Рябина М.В.	461
Борщев Ю.Ю.	443	Козлов В.А.	431	Савченко А.А.	431
Брусев О.С.	479	Корсунский И.А.	467	Симбирцев А.С.	423
Бут-Гусаим В.И.	407	Котылева М.П.	443	Слепова О.С.	461
Васильева Е.Ф.	479	Крамская Т.А.	443	Смирнова А.С.	467
Гордукова М.А.	467	Кудрявцев И.В.	431	Сорожкина Е.С.	461
Гусев К.В.	479	Куликова И.Г.	461	Стагниева И.В.	423
Давыдова Н.В.	467	Леонтьева Г.Ф.	443	Суворов А.Н.	443
Даниленко В.Н.	443	Литвиненко С.Н.	407	Тарасова Е.А.	443
Друцкая М.С.	395	Литвинова Л.С.	407	Топол И.А.	455
Еремеева Е.А.	461	Мишукова О.В.	467	Фактор М.И.	479
Ермоленко Е.И.	443	Мошев А.В.	431	Федоров А.С.	407
Ефимов Г.А.	395	Недоспасов С.А.	395	Филипенко М.Л.	467
Зимин С.Б.	467	Никитина И.А.	467	Черемных Е.Г.	479

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активность комплемента	480	первичный иммунодефицит	468
аллерген-специфическая иммунотерапия	408	подсчет клеток	480
аллергические заболевания	408	прибор БиоЛаТ	480
аллерговакцины	408	провоспалительные цитокины	395
аллергокомпоненты	408	рак	395
бифидобактерии	443	риносинусит	423
вакцина «Псевдовак»	432	система комплемента	480
В-лимфоциты	432	сублингвальная иммунотерапия	408
возрастная макулярная дегенерация	461	субпопуляции	461
диагностика	468	субстанция Р	423
дисбиоз	443	Т-лимфоциты	432
иммунная система	432	Т-регуляторные клетки	432
иммунный статус	423	хроническая обструктивная болезнь легких	432
иммунодефицит	423	хронический социальный стресс	455
иммунологические контрольные точки	395	цитокины	423, 443
иммунология	395	энтерококки	443
иммунотерапия	395	Adrβ2	455
количественная ПЦР	468	IL-17α	455
кровь	461	IL-1β	455
лактобациллы	443	KREC	468
лимфоциты	461	Nlrp3	455
лицевая боль	423	Nr3c1	455
мажорные и минорные аллергены	408	<i>Tetrahymena pyriformis</i>	480
моноклональные антитела	395	TREC	468
обработка изображения	480		

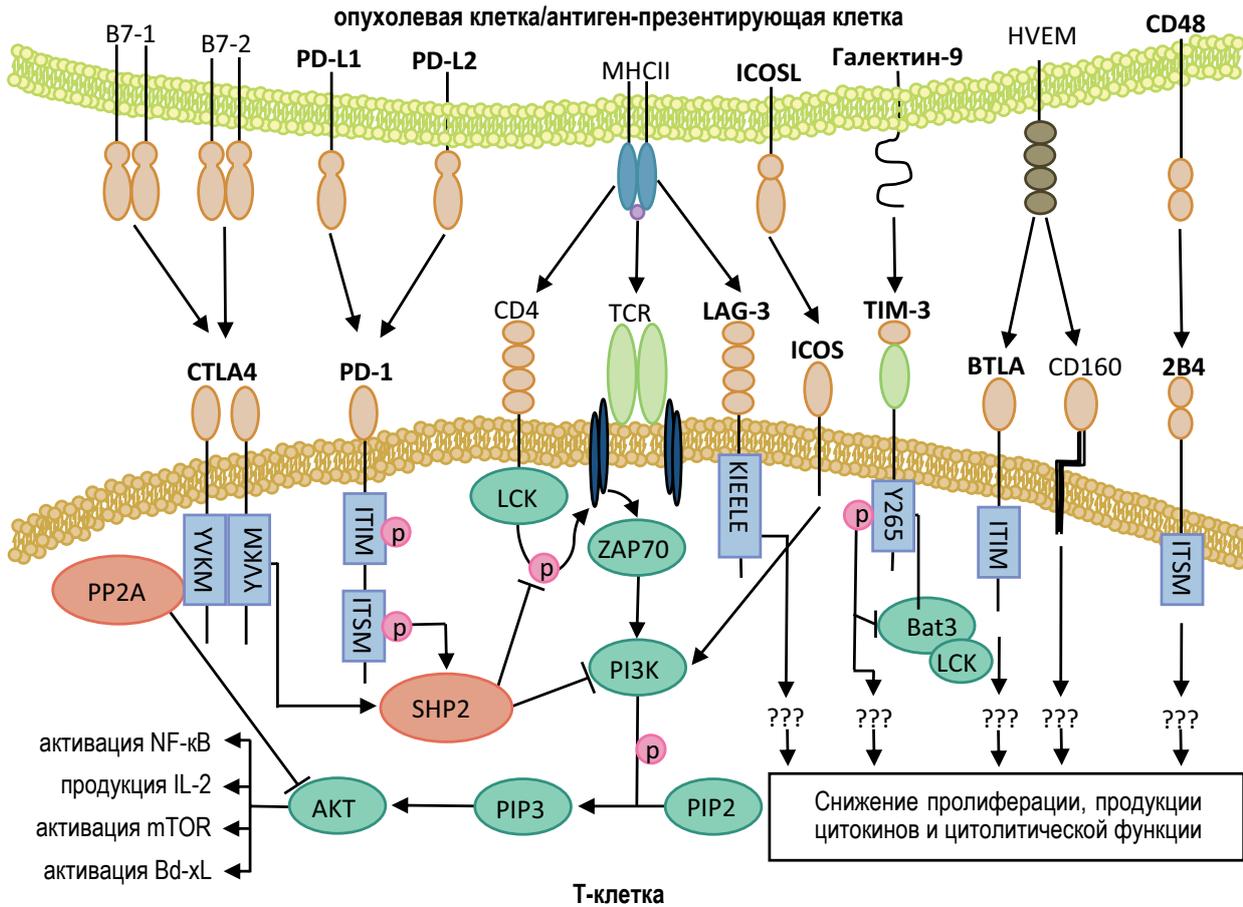


Рисунок 3. Схема передачи сигнала от различных молекул на поверхности Т-клетки

Примечание. Жирным шрифтом отмечены ИКТ, упоминающиеся в тексте.

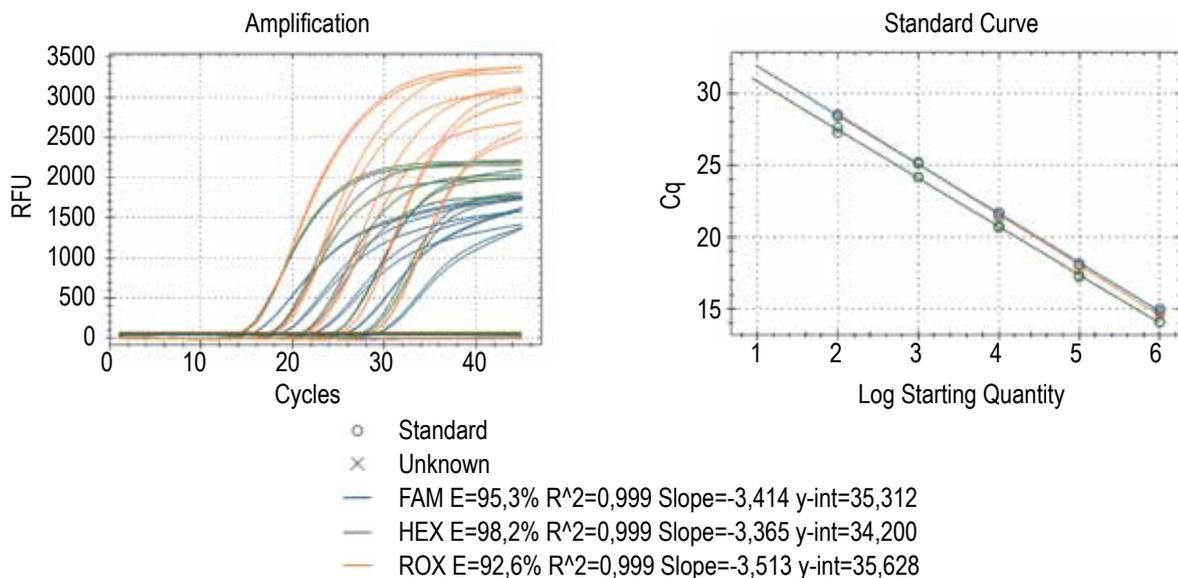
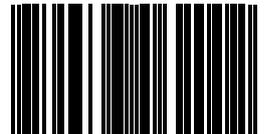


Рисунок 1. Линейный диапазон количественной амплификации мишеней TREC, KREC и IL-17га в области концентраций от $5 \cdot 10^6$ коп/мл до 50 копий на реакцию. Пример построения калибровочной кривой с использованием полученных нами стандартных образцов ДНК (калибраторов)

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >