

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

Том 17, № 6. С. 493-588

2015

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

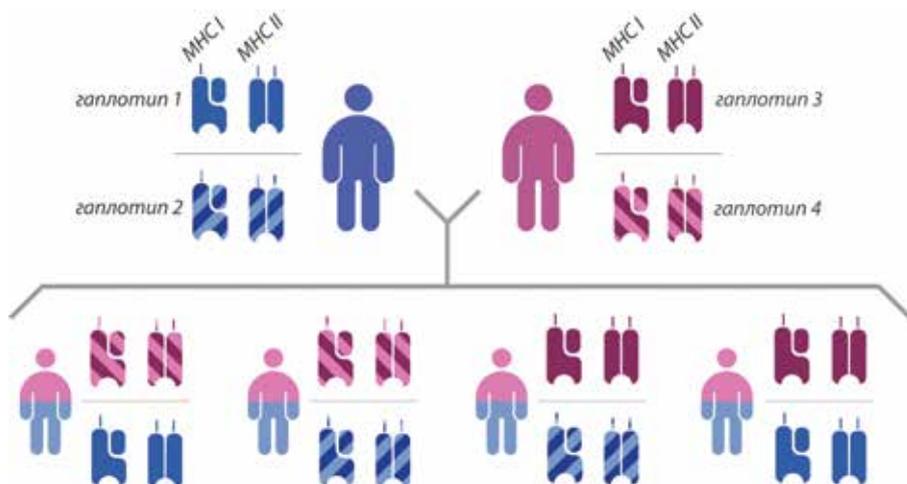


Рисунок 1. Механизм наследования HLA-гаплотипов

Примечание. Поскольку в HLA-локусе практически не происходит кроссинговера, то гаплотипы наследуются целиком. Каждый из детей имеет один материнский и один отцовский гаплотип. Таким образом пара сиблингов в 25% случаев будет полностью HLA идентична, а еще в 50% иметь один идентичный HLA-гаплотип. Родители и дети всегда гаплويدентичны.

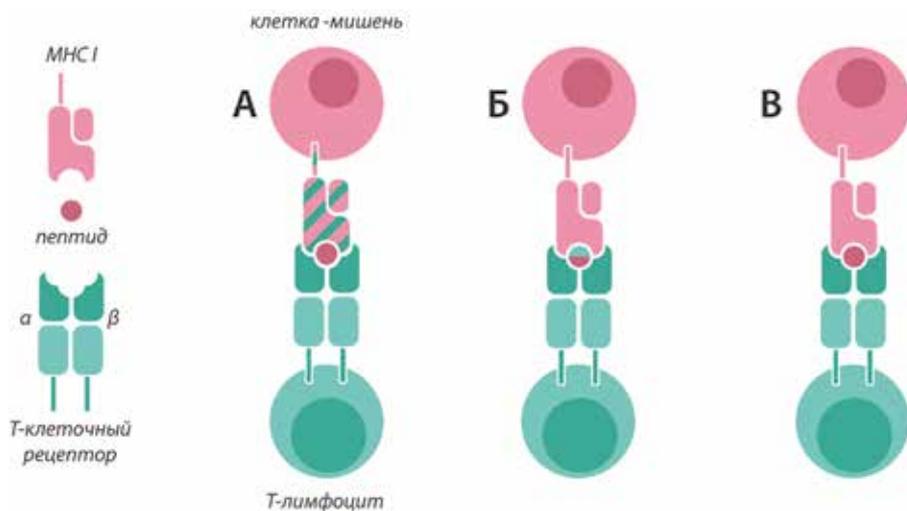


Рисунок 2. Варианты аллораспознавания

Примечание. Иммунный ответ при алло-ТГСК может возникать на: (А) аллогенный пептид в контексте общей для донора и реципиента аллели HLA, (Б) чужеродную аллель HLA в комплексе с аутологичным пептидом или (В) чужеродный пептид, представленный в чужеродной аллели HLA.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2015, том 17

№ 6

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 последиplomного образования Минздрава России, Москва, Россия

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

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

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

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, 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 11.11.2015 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 12. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1327

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

**MEDICAL
IMMUNOLOGY/
MEDITSINSKAYA
IMMUNOLOGIYA**

November-December

2015, volume 17

No. 6

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 11.11.2015. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 12. 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

Ефимов Г.А., Вдовин А.С., Григорьев А.А., Филькин С.Ю., Быкова Н.А., Савченко В.Г.
ИММУНОБИОЛОГИЯ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА» 499

Оригинальные статьи

Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И.
МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ МЕЛАТОНИНА НА ИММУННЫЙ СТАТУС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ
В УСЛОВИЯХ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ 517

Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Кробинец И.И., Савченко А.А., Серебрякова М.К.
ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ
МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ 525

Останин А.А., Старостина Н.М., Меледина И.В., Шипунов М.В., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Черных Е.Р.
МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ
ПЕЧЕНИ 539

Ширинский И.В., Сазонова О.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С.
КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АДЕМЕТИОНИНА У БОЛЬНЫХ
ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРИТОМ: ПЕРЕКРЕСТНОЕ ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 553

Краткие сообщения

Алекберзаде А.В., Липницкий Е.М., Бадалов Д.А.
ОСТРАЯ ФАЗА СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ ОДНОПОРТОВОЙ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ
ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ 561

Галимова Э.С., Хуснутдинова Э.К.
ГЕН РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА 28 АЛЬФА *IL28RA* И ПСОРИАЗ: АССОЦИАЦИЯ С ТЯЖЕСТЬЮ БОЛЕЗНИ
И ВОЗРАСТОМ МАНИФЕСТАЦИИ 567

Исаева Н.В., Зайцева Г.А., Докшина И.А.
ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ
НА ЭТАПЕ ДИАГНОСТИКИ 573

Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н.
ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ
МИЕЛОМНОЙ БОЛЕЗНЬЮ G-ФОРМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ 579

Правила для авторов 585

Авторский указатель 588

Предметный указатель 588

CONTENTS

Reviews

Efimov G.A., Vdovin A.S., Grigoryev A.A., Filkin S.Yu., Bykova N.A., Savchenko V.G.
IMMUNOBIOLOGY OF ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE 499

Original articles

Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I.
**MECHANISMS OF MELATONIN EFFECTS UPON IMMUNE STATE IN EXPERIMENTAL DESYNCHRONOSES
PRODUCED UNDER THE LED ILLUMINATION CONDITIONS 517**

Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Krobinets I.I., Savchenko A.A., Serebryakova M.K.
MULTICOLOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF CYTOTOXIC T CELL SUBSETS 525

Ostanin A.A., Starostina N.M., Meledina I.V., Shipunov M.V., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Chernykh E.R.
A MULTIPLEX ASSAY OF 26 CYTOKINES SECRETED BY BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS 539

Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S.
**CLINICAL EFFICACY AND SAFETY OF ADEMETIONINE IN PATIENTS WITH DIABETES-ASSOCIATED
OSTEOARTHRITIS: A CROSS-OVER PILOT STUDY 553**

Short communications

Alekberzade A.V., Lypnitskiy E.M., Badalov J.A.
**ACUTE PHASE OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE FOLLOWING A SINGLE-PORT LAPAROSCOPIC
CHOLECYSTECTOMY 561**

Galimova E.S., Khusnutdinova E.K.
**INTERLEUKIN 28 RECEPTOR GENE ALPHA *IL28RA* AND PSORIASIS: ASSOCIATION WITH DISEASE SEVERITY
AND AGE AT ONSET 567**

Isaeva N.V., Zaitseva G.A., Dokshina I.A.
**FEATURES OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA
AT PRIMARY DIAGNOSIS 573**

Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Yu.N.
**CHARACTERISTICS OF NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE IN PATIENTS WITH TYPE G MULTIPLE MYELOMA
AT DIFFERENT STAGES OF THE DISEASE..... 579**

Instructions to Authors 585

Author index 588

Subject index..... 588

ИММУНОБИОЛОГИЯ ОСТРОЙ РЕАКЦИИ «ТРАНСПЛАНТАТ ПРОТИВ ХОЗЯИНА»

Ефимов Г.А., Вдовин А.С., Григорьев А.А., Филькин С.Ю.,
Быкова Н.А., Савченко В.Г.

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

Резюме. Для целого ряда заболеваний системы кроветворения единственным методом излечения является аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, которая имеет своей целью замену кроветворной системы реципиента на донорскую. Однако попадание в организм реципиента содержащихся в трансплантате зрелых Т-лимфоцитов может приводить к развитию тяжелого пост-трансплантационного осложнения – реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ). Она вызвана тем, что иммунная система донора содержит клоны Т-лимфоцитов, специфичные к аллоантигенам реципиента, которые, встречая свои антигены, активируются и вызывают системное повреждение здоровых тканей. Наличие аллореактивных клонов обусловлено генетическими различиями между донором и реципиентом. Важнейшим фактором, определяющим успех трансплантации, является совместимость по генам главного комплекса гистосовместимости, которые экспрессируются во всех ядерных клетках и отвечают за презентацию антигенов клеткам иммунной системы.

В настоящее время созданы обширные банки доноров стволовых гемопоэтических клеток, которые позволяют подобрать для большинства пациентов совместимого донора. Однако это не полностью предотвращает развитие РТПХ, так как помимо генов главного комплекса гистосовместимости, донор и реципиент могут различаться по так называемым минорным антигенам совместимости. Минорные антигены обусловлены генетическими полиморфизмами во всех кодирующих областях генома. Дополнительным фактором, способствующим развитию реакции «трансплантат против хозяина», является предтрансплантационная подготовка пациента, которая необходима для приживания трансплантата, но в качестве побочного эффекта приводит к формированию в организме реципиента провоспалительного окружения.

Тяжелые формы РТПХ развиваются приблизительно у 40% пациентов, совпадающих по генам главного комплекса гистосовместимости, а в случаях неполной совместимости эта доля еще больше. Смертность от РТПХ сравнима с другими причинами посттрансплантационной летальности, такими как рецидив изначального заболевания и вирусные инфекции. Таким образом, развитие тяжелых форм РТПХ существенно лимитирует клиническое применение трансплантации стволовых кроветворных клеток. Агрессивная иммуносупрессия или исключение из трансплантата донора зрелых Т-лимфоцитов приводит к увеличению вероятности рецидива и ослабляет противоинфекционный иммунитет, что требует поиска альтернативных, более специфичных путей профилактики реакции «трансплантат против хозяина».

В настоящем обзоре будут рассмотрены механизмы формирования аллореактивных клонов Т-лимфоцитов и этапы патогенеза острой формы реакции «трансплантат против хозяина».

Ключевые слова: РТПО, РТПХ, трансплантация костного мозга, аллореактивность, иммунобиология, молекулярные механизмы

Адрес для переписки:

Ефимов Григорий Александрович
ФГБУ «Гематологический научный центр»
Министерства здравоохранения РФ
125167, Россия, Москва, Новый Зыковский пр., 4.
Тел.: 8 (964) 551-55-51.
E-mail: efimov.g@blood.ru

Address for correspondence:

Efimov Grigory A.
National Research Center for Hematology
125167, Russian Federation, Moscow,
Novy Zykovsky proezd, 4.
Phone: 7 (964) 551 5551.
E-mail: efimov.g@blood.ru

Образец цитирования:

Г.А. Ефимов, А.С. Вдовин, А.А. Григорьев, С.Ю. Филькин,
Н.А. Быкова, В.Г. Савченко, «Имунобиология острой
реакции „трансплантат против хозяина“» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 499-516.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-449-516

© Ефимов Г.А. и соавт., 2015

For citation:

G.A. Efimov, A.S. Vdovin, A.A. Grigoryev, S.Yu. Filkin,
N.A. Bykova, V.G. Savchenko, "Immunobiology of acute graft-
versus-host disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 499-516.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-449-516

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-449-516>

IMMUNOBIOLOGY OF ACUTE GRAFT-VERSUS-HOST DISEASE

Efimov G.A., Vdovin A.S., Grigoryev A.A., Filkin S.Yu., Bykova N.A., Savchenko V.G.

National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Transplantation of allogeneic hematopoietic stem cells is the only curative option for a number of diseases of hematopoietic system. It is intended to replace the hematopoietic system of the recipient with the donor's. However, when mature T cells contained in the graft enter the recipient organism, it may lead to a severe post-transplant complication, the "graft versus host" disease (GVHD). It occurs due to the fact that the donor immune system contains T cell clones specific to recipient alloantigens. These cell clones are activated upon encountering their antigens, thus causing systemic damage to healthy tissues. Development of the alloreactive clones is caused by genetic differences between donor and recipient. The most important factors determining successful transplantation concern the compatibility for the genes coding for Major Histocompatibility Complex (MHC), that are expressed in all nucleated cells and are responsible for antigen presentation to the immune cells.

Currently established extensive donor banks allow for majority of patients to choose a compatible donor. However, this does not provide complete prevention of the GVHD development, because in addition to the MHC genes the donor and recipient may differ in so-called minor histocompatibility antigens. Minor antigens may be caused by genetic polymorphisms in all of the genome coding regions. Pre-transplantation conditioning of the patient, which is necessary for engraftment represent an additional factor contributing to the GVHD development, since as its side effect it leads to formation of a pro-inflammatory environment in the organism of recipient.

Severe GVHD develops in approximately 40% of MHC-matched patients, while in cases of partial compatibility this proportion is even higher. GVHD causes mortality comparable to other causes of post-transplant death, such as viral infections or relapse of underlying disease. Thus, the development of severe GVHD is a significant limitation for clinical applications of stem cell transplantation. Severe immune suppression or depletion of mature donor T cells from the transplant leads to increased probability of relapse and weakens anti-infectious immunity. Hence, further search for alternative, more specific ways to prevent GVHD is required. This review will focus on the mechanisms of alloreactive T lymphocyte clone development and key pathogenetic stages of acute "graft versus host" disease.

Keywords: graft-versus-tumor reaction, graft-versus-host disease, bone marrow transplantation, alloreactivity, immunobiology, molecular mechanisms

Введение

Возникшая у позвоночных система адаптивного иммунитета потенциально способна распознавать любые патогенные микроорганизмы, в том числе ранее не встречавшиеся в процессе эволюции. Это достигается за счет того, что гены, кодирующие антигенраспознающие молекулы — В- и Т-клеточные рецепторы — находятся в геноме в неокончательно сформированном варианте, они создаются в процессе случайной рекомбинации кодирующих фрагментов в каждом индивидуальном клоне лимфоцитов. Для того чтобы исключить формирование аутореактивных клонов, процессы формирования лимфоцитов и развития иммунного ответа содержат многочисленные механизмы контроля.

Центральная толерантность к аутоантигенам достигается за счет того, что вновь образованные Т-лимфоциты, несущие возникший в результате случайной рекомбинации Т-клеточный рецептор (ТКР), проходят созревание в тимусе, где клетки медуллярного эпителия демонстрируют им антигенный репертуар организма. Лимфоциты,

распознающие собственные антигены со значительной аффинностью, вступают в апоптоз и элиминируются из Т-клеточного пула. Однако часть потенциально аутореактивных Т-лимфоцитов все же попадет в системную циркуляцию [35]. Дополнительная ступень контроля, обеспечивающая периферическую толерантность, заключается в том, что для активации наивной (ранее не встречавшей свой антиген) клетки требуется сочетание специфического сигнала от ТКР и ко-стимуляторного сигнала, который передается ей активированной антигенпрезентирующей клеткой (АПК). В случае, когда презентация антигена не сопровождается экспрессией провоспалительных молекул, Т-клетка переходит в состояние анергии или становится Т-регуляторной клеткой [122].

Аллогенная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) применяется для лечения ряда гемобластозов и наследственных заболеваний кроветворной ткани. Она включает в себя уничтожение или подавление кроветворения пациента и последующую транс-

плантацию кроветворных стволовых клеток (происходящих из костного мозга, периферической крови или пуповинной крови) от родственного или неродственного донора. Трансфузия зрелых $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов вместе со стволовыми гемопоэтическими клетками обеспечивает восстановление иммунной системы пациента, однако в качестве осложнения она способна вызывать иммунный ответ на здоровые ткани реципиента — реакцию «трансплантат против хозяина» (РТПХ). РТПХ принято разделять на две формы: острую и хроническую (оРТПХ и хРТПХ). Формальным критерием является срок возникновения осложнения: реакцию, развивающуюся в течение первых 100 дней после трансплантации, считают острой, а после 100 дней — хронической [48]. Однако это разделение условно: проявления оРТПХ возможны после 100 дней, а хРТПХ может развиться ранее. Но по сути, в основе острой и хронической РТПХ лежат различные иммунологические механизмы.

Острая форма РТПХ обусловлена активацией системы адаптивного иммунитета и специфическим распознаванием Т-клетками донора антигенов реципиента, в результате которого активированные донорские Т-лимфоциты атакуют ткани реципиента. Хотя иммунный ответ при оРТПХ возникает на антигены реципиента, аллогенные для донора, ее можно рассматривать как форму острой аутоиммунной патологии, поскольку в основе развития оРТПХ лежат нарушения механизмов предотвращения аутоиммунных реакций. Во-первых, Т-лимфоциты донора не проходили отбор на неспособность распознавать уникальные антигены реципиента (отсутствие центральной толерантности), а во-вторых — предтрансплантационная химио- и/или радиотерапия вызывает массивное повреждение тканей, что приводит к повышенному уровню экспрессии провоспалительных цитокинов и системной активации АПК, которые предоставляют аллореактивным Т-клеткам необходимый костимуляторный сигнал (срыв периферической толерантности). Сочетание этих двух факторов приводит к запуску острой формы РТПХ [41].

хРТПХ представляет собой системное аутоиммунное заболевание, развитие которого было спровоцировано трансплантацией гемопоэтических клеток и последующей оРТПХ. При этом роль прямого аллораспознавания при хронической форме РТПХ не очевидна, за счет повреждения тимуса при кондиционировании и оРТПХ ответ может развиваться и на аутоантигены, общие для донора и реципиента. Также в патогенезе хронической формы РТПХ важную роль играют В-клетки и вырабатываемые ими аутоантитела [101].

В 1970-х годах, когда алло-ТГСК начала успешно применяться, первоначальной терапевтической целью было восстановление в организме пациента гемопоэза, уничтоженного радио- и химиотерапией. Однако довольно быстро было замечено, что трансплантат обладает собственным противоопухолевым эффектом [121]. Те же механизмы, которые лежат в основе формирования оРТПХ, обеспечивают один из важнейших терапевтических эффектов алло-ТГСК — распознавание иммунной системой донора опухолевой ткани (реакция «трансплантат против опухоли», РТПО). Именно за счет противоопухолевой активности донорских клеток достигается уничтожение резистентных к химио- и радиотерапии бластных клеток и формирование стойкой ремиссии [17]. Гемобласты относятся к злокачественным заболеваниям с невысоким общим количеством мутаций [2], что означает, что в большинстве случаев мутации, возникшие *de novo* в злокачественном клоне, не представляются в качестве поверхностных антигенов. Таким образом, ответ развивается преимущественно на аллоантигены, общие для опухолевой и здоровой кроветворной ткани реципиента [123].

В настоящее время аллогенная трансплантация стволовых клеток крови применяется для лечения острых и хронических лейкозов, ходжкинской и неходжкинской лимфом, миелодиспластического синдрома, множественной миеломы, а также некоторых видов солидных опухолей [116]. Алло-ТГСК имеет большой терапевтический потенциал для целого ряда неопластических заболеваний (включая солидные опухоли) и заболеваний иммунной системы, однако ее применимость существенно ограничена из-за риска развития тяжелых и потенциально летальных форм РТПХ. Для того чтобы минимизировать РТПХ, сохраняя терапевтический эффект РТПО, необходима разработка новых подходов, основанных на детальном понимании молекулярных механизмов развития РТПХ.

I. Молекулярные механизмы аллореактивности

Главный комплекс гистосовместимости

Ключевую роль в аллогенном иммунном ответе, обуславливающим как РТПО, так и РТПХ, играют молекулы главного комплекса гистосовместимости (Major Histocompatibility Complex, МНС), так как именно они презентруют на поверхности клеток антигены, распознаваемые Т-клеточными рецепторами. Антиген, а в случае Т-клеток это пептид длиной от 8 до 20 аминокислот, помещен в бороздку, стенки которой сформированы МНС [12], и так как взаимодействие происходит между поверхностями ТКР и комплекса МНС-пептид [45], для узнавания важна не только последовательность пептида, но и структура МНС.

Поскольку гены, кодирующие МНС, являются высокополиморфными (то есть в популяции имеется множество аллельных и, соответственно, структурных вариантов), совместимость донора и пациента по аллелям МНС играет важнейшую роль. Свой вклад в формирование аллогенного иммунного ответа вносят и пептидные аллоантигены. Далее будут рассмотрены механизмы образования аллореактивных клонов в ситуации полной и неполной совместимости по генам МНС.

Гены, кодирующие МНС, у человека также называются HLA (Human Lymphocyte Antigen) и находятся на 6-ой хромосоме в нескольких локусах, расположенных в регионах МНС I и МНС II, разделенных участком 6-ой хромосомы, исторически называемым МНС III, но не содержащим генов, участвующих в презентации пептидов.

МНС I локус включает в себя три классических гена: HLA-A, -B и -C. Кодируемые ими белки находятся на поверхности всех ядерных клеток организма, их функция заключается в презентации цитотоксическим (CD8⁺) лимфоцитам пептидов, получающихся в результате деградации эндогенных клеточных белков, которые для инфицированных клеток также включают в себя и вирусные белки. Регион МНС II содержит гены HLA-DQ, -DP и -DR. Они экспрессируются в специализированных антиген-презентирующих клетках иммунной системы (дендритные клетки, макрофаги и В-клетки), а источником представляемых МНС II пептидов являются преимущественно внеклеточные антигены, захватываемые при фагоцитозе и пиноцитозе, в том числе белки, происходящие из патогенов (в этом случае пептиды образуются при расщеплении белков в эндосоме катепсинами и другими протеолитическими ферментами). Комплексы пептид-МНС II узнаются CD4⁺ лимфоцитами. Собственные клеточные белки также могут представляться в МНС II класса. При этом мембранные и секреторные белки транспортируются в эндоплазматический ретикулум (ЭПР) при синтезе, а цитоплазматические белки доставляются в результате аутофагии или прямого трансмембранного переноса [115, 128].

Кроме того, существует механизм, который обеспечивает презентацию пептидов, происходящих из экзогенных белков, в МНС I. Этот феномен называется кросс-презентацией и играет важную роль в активации наивных CD8⁺ лимфоцитов и патогенезе ОРТПХ.

Степень совпадения донора по генам HLA является одним из главных факторов, влияющих на вероятность развития ОРТПХ [4], а следовательно, важнейшим критерием для подбора донора.

Каждый индивид имеет от 6 до 14¹ различных классических МНС генов I и II класса, а всего в популяции существует более 9000 аллелей, различающихся по аминокислотной последовательности в пептид-связывающих доменах (все описанные полиморфизмы в генах HLA содержатся в базе данных dbMHC: <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/mhc/>). Поскольку кроссинговера в локусе МНС, как правило, не происходит [28], весь HLA-гаплотип наследуется целиком (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Таким образом, сиблинги имеют 25%-ную вероятность быть полностью идентичными по генам HLA [38], а у родителей и детей как минимум половина аллелей одинаковые.

Для пациентов, не имеющих HLA-идентичного сиблинга, возможно подобрать полностью или частично HLA-идентичного неродственного донора. Крупномасштабные программы HLA-типирования и развитие международных донорских банков привели к тому, что для 70% пациентов европеоидной расы возможно подобрать по крайней мере одного неродственного донора, совпадающего по 8/8 или 10/10 аллелям [54].

Трансплантация от донора, имеющего один полностью идентичный гаплотип, называется гаплоидентичной трансплантацией², и, хотя при ней значительная часть HLA-генов у донора и реципиента отличается, частота развития тяжелых форм РТПХ не превышает таковую для трансплантации от HLA-идентичного неродственного донора и даже приближается к таковой для HLA-идентичных сиблингов [66, 96, 126]. Это может объясняться как различиями в протоколах иммуносупрессии, так и преимуществами сравнительно более молодого возраста гаплоидентичных доноров, так как для пожилых пациентов эту роль могут выполнить дети.

Несовпадения по отдельным генам МНС вносят неодинаковый вклад в развитие тяжелых форм РТПХ, так различия по МНС II генам HLA-DRB1 и -DQB1 малоиммуногенны, а несовпадения по МНС I генам более опасны с точки зрения вероятности развития РТПХ. Среди генов МНС I класса также существует иерархия несовпадений по степени иммуногенности. Несовпадения по HLA-B и -C переносятся легче, чем по HLA-A [72]. Также описаны «недопустимые» несовпадения [31, 64, 134]. При этом важно отметить, что иммуногенность не зависит от степени гомологии чужеродной аллели с донорской. Так, одна аминокислотная замена между аллелями В*44:02 и В*44:03 связана с высоким риском ОРТПХ [42,

¹ Разнообразие уменьшается за счет гомозиготности по отдельным генам или целым гаплотипам. Кроме того, в некоторых гаплотипах HLA DR кластер содержит дополнительный кодирующий ген β-цепи и таким образом образуется дополнительная аллель HLA-DR [69].

² Роль донора в этом случае выполняют родители, дети или сиблинги пациента.

65], тогда как несовпадения по значительно различающимся аллелям более приемлемы [53].

Сильно различающиеся аллели часто оказываются более допустимыми, так как в этом случае снижено число потенциально реактивных клонов.

Дополнительный вклад в вероятность развития РТПХ вносит неодинаковый уровень экспрессии различных генов HLA [58, 95].

Формирование аллореактивных клонов

Т-клеточный репертуар формируется в тимусе в результате последовательных этапов положительной и отрицательной селекции. Сначала отбираются только клетки, способные взаимодействовать с собственными молекулами МНС с аффинностью выше пороговой. Затем из этого множества элиминируются потенциально аутореактивные клетки, чьи рецепторы имеют высокую аффинность к собственным пептидам. Отобранный в результате репертуар содержит клоны, способные распознавать любые, за исключением собственных, пептиды, представленные в контексте собственных аллелей МНС.

Таким образом, при HLA-идентичной трансплантации репертуар донора неизбежно содержит клоны, способные распознавать пептиды реципиента, которые не представлялись в тимусе донора. В этом случае популяция аллореактивных клонов распознает аллогенные пептиды в контексте общих молекул МНС (рис. 2А, см. 2-ю стр. обложки).

В случае, когда МНС донора и реципиента не полностью совпадают, аллореактивность может развиваться также за счет того, что Т-клеточный рецептор, умеренно аффинный к одной из собственных аллелей МНС, может случайно оказаться высокоаффинным к комплексу собственного пептида с чужеродной МНС (рис. 2Б, см. 2-ю стр. обложки). Это объясняется тем, что ТКР распознает суммарную антигенную поверхность комплекса пептид-МНС, и любые ее изменения могут оказаться иммуногенными. Так, ингибитор обратной транскриптазы абакавир специфично связывается с МНС аллелью HLA-B*5701, а противосудорожный препарат карбамазепин – с HLA-B*1502, что приводит к изменению антигенной поверхности и развитию тяжелой аутоиммунной реакции, имеющей симптоматику злокачественной экссудативной эритемы или токсического эпидермального некролиза [29, 77].

Этот механизм достаточно распространен, и в зависимости от несовпадающей аллели до 10% донорских клеток могут оказаться аллореактивными в новом хозяине [8]. Тем самым их количество на порядок превышает число клеток, специфичных даже к самым распространенным вирусным эпитопам.

Кроме того, возможна комбинация этих двух механизмов, когда Т-лимфоциты распознают незнакомые пептиды, представленные чужеродными аллелями МНС (рис. 2В, см. 2-ю стр. обложки). При этом соотношение двух типов аллореактивности при неполном совпадении МНС не изучено и является важным и интересным вопросом для исследования.

Популяция аллореактивных клеток гетерогенна по своей специфичности: некоторые клоны распознают только конкретный пептид в контексте чужеродной аллели МНС, другие обладают средством к широкому спектру пептидов.

Хотя, за исключением случаев иммунизации при беременности, Т-клетки донора не встречали антигены реципиента до трансплантации, аллореактивными могут быть клетки памяти. Это объясняется феноменом кросс-реактивности вирус-специфических Т-лимфоцитов к чужеродным МНС в комплексе с аутологичным пептидом. Так, клетки, несущие рецепторы, специфично узнающие вирусные пептиды в контексте определенной аллели МНС, оказываются кросс-реактивными с аллогенной молекулой HLA [34]. При этом порог активации для клеток памяти существенно снижен, после встречи со специфичным антигеном эти клетки проходят быструю реактивацию и экспансию и затем начинают оказывать цитотоксические эффекты.

Дополнительный вклад в аллореактивность могут вносить Т-лимфоциты, имеющие два различных рецептора. В процессе созревания Т-лимфоцита после успешного перестраивания β -цепи происходит последовательная реаранжировка обоих локусов α -цепи. За счет этого могут получаться клетки, несущие две различные α -цепи и, соответственно, два различных рецептора. При этом один из них может маскировать другой от процессов положительной и отрицательной селекции [91]. Среди аллореактивных клонов обнаруживается непропорционально высокое количество клонов с двойной специфичностью [86].

Минорные антигены гистосовместимости

Развитие РТПХ при полностью HLA-идентичной трансплантации обусловлено иммунным распознаванием пептидов, презентруемых молекулами МНС в организме реципиента, но отсутствующих у донора. Эти пептиды, называемые минорными антигенами гистосовместимости (Minor Histocompatibility Antigens, MiHA), образуются в результате генетических полиморфизмов, расположенных вне HLA-локуса. В геноме человека содержится около 1×10^5 несинонимичных однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) [90], кроме того, могут встречаться инсерции/делеции большего размера.

Наличие несинонимичных нуклеотидных замен в геноме реципиента приводит к тому, что

в его организме иммунопептидом (совокупность всех пептидов, представленных в молекулах МНС) неизбежно отличается от донорского. Так, для пары сиблингов с одинаковым набором МНС аллелей пересечение иммунопептидомов составляет 85%. В их иммунопептидомах было обнаружено 34 непересекающихся пептида, обусловленных аминокислотными заменами ОНП (что составило всего 0,5% от всех несинонимичных ОНП) [49]. У неродственных HLA-идентичных пар иммунопептидомы различаются еще сильнее, а иммунопептидомы людей с разными HLA-гаплотипами вследствие разной специфичности аллелей МНС к пептидам почти не пересекаются.

Минорные антигены можно разделить на две группы: в первом случае аминокислотная замена приводит к тому, что в иммунопептидом попадает пептид, который ранее там не был представлен (как правило, это связано с изменением сродства пептида к МНС); во втором случае и исходный, и вариантный пептид представляются в комплексе с МНС. В этом случае аллорекативные клоны оказываются способны распознать одну аминокислотную замену в презентуемом пептиде.

На включение или исчезновение того или иного пептида из иммунопептидома кроме аффинности пептидов к молекулам МНС влияют процессы протеасомной деградации его исходного белка и транспортировка пептида в эндоплазматический ретикулум (ЭПР). На каждом из этих этапов происходит конкуренция и отбор пептидов, в результате чего в иммунопептидомы различных тканей попадает 3000-7000 пептидов [9].

В большинстве случаев минорные антигены имеют одностороннюю иммуногенность. То есть для того, чтобы развился иммунный ответ на минорный антиген, необходимо, чтобы донор был гомозиготен по неиммуногенной аллели, а реципиент имел хотя бы одну иммуногенную.

Хотя количество клонов наивных Т-лимфоцитов, специфичных к каждому конкретному минорному антигену, невелико, быстрая экспансия клеток, распознавших свой антиген, вызывает клинические проявления оРПТХ. Кроме того, возникает синергия иммунного ответа за счет того, что донор и реципиент различаются сразу по многим минорным антигенам.

Поскольку оРПТХ при HLA-идентичных трансплантациях вызывается исключительно ответом на минорные антигены, определение несовпадений по ним является актуальной задачей. При этом генотипирование донора и реципиента по минорным антигенам существенно сложнее, чем по HLA-аллелям, поскольку в этом случае требуется не только секвенирование всех кодирующих участков генома, но и предсказание того, какие из полиморфизмов будут представляться

в виде пептидов в данном наборе МНС молекул. Несмотря на то, что существует целый ряд алгоритмов, позволяющих отобрать кандидатные минорные антигены на основании генетических полиморфизмов, требуется экспериментальное подтверждение попадания конкретного пептида в иммунопептидом, а также его иммуногенности.

Даже обладая информацией обо всех иммуногенных минорных антигенах пациента, статистически очень маловероятно подобрать полностью MiHA идентичного донора (за исключением гомозиготных близнецов). Кроме того, полное исключение аллорекативности нежелательно, так как в случае HLA-совместимой трансплантации РТПО развивается именно за счет несовпадений по минорным антигенам. Сингенные трансплантации не приводят к элиминации опухолевого клона и, соответственно, имеют более высокую частоту рецидивов [44].

В отличие от молекул МНС I класса, которые экспрессируются на всех ядерных клетках, полиморфные пептиды происходят из белков, имеющих различные профили экспрессии. Тем самым различные типы клеток представляют различные пептидомы. Существуют минорные антигены, специфично экспрессирующиеся в гематопозитической ткани [51, 112]. За счет дифференциальной экспрессии минорных антигенов теоретически возможно специфически разделить РТПО и РТПХ, модифицируя трансплантат таким образом, чтобы он содержал лимфоциты, специфичные к минорным антигенам, экспрессирующимся в гематопозитической ткани, и не содержал клеток, реагирующих на широко экспрессированные минорные антигены. Это делает крайне актуальным поиск новых клинически значимых минорных антигенов и разработку алгоритмов, предсказывающих состав иммунопептидома.

Этапы развития оРТПХ

Развитие острой формы РТПХ, ее локализация и степень выраженности зависят от состава и динамики изменения клеточного окружения, секреции сигнальных молекул, регулирующих миграцию, пролиферацию и дифференцировку эффекторных клеток. В развитии РПТХ можно выделить три основные стадии. Отправной точкой формирования РПТХ является возникновение провоспалительного цитокинового фона [40], в результате чего активируются антиген-презентирующие клетки. На следующем этапе Т-лимфоциты донора, встречающие специфические антигены в контексте провоспалительного окружения, проходят клональную экспансию и дифференцировку. В заключительной фазе активированные Т-клетки мигрируют в органы-мишени и вызывают массивную гибель клеток, что приводит к высвобождению новых аутоантигенов и молекул стресса и формирует петлю положительной обратной связи. Схематически

стадии развития оРТПХ изображены на рисунке 3 (см. 3-ю стр. обложки).

1. Повреждающее действие предтрансплантационного кондиционирования

Первая фаза развития оРТПХ начинается еще до трансплантации, когда больным проводится курс лучевой или химиотерапии, или их комбинация. Целью предтрансплантационного кондиционирования является, с одной стороны, значительное сокращение числа опухолевых клеток, а с другой – устранение Т-клеток, которые могут вызвать отторжение трансплантата и подавление кроветворения реципиента. Органы кроветворения содержат специализированные гемопоэтические ниши, которые необходимо освободить от клеток-предшественников донора. Эксперименты на животных показали, что даже при введении сверхвысоких доз клеток от сингенных доноров уровень химеризма в отсутствие кондиционирования крайне ограничен [97, 114]. Также без подавления собственного кроветворения не происходит приживление трансплантата у пациентов с синдромом тяжелого комбинированного иммунодефицита (severe combined immunodeficiency, SCID), которые не способны развить иммунную реакцию против трансплантата [21].

По степени элиминации кроветворной ткани пациента разделяют миелоаблативный и немиелоаблативный виды кондиционирования. В последнее время все чаще применяется немиелоаблативное кондиционирование, поскольку было показано, что для пациентов, находящихся в ремиссии, усиление радио- и химиотерапии не приводит к уменьшению числа рецидивов, в то же время существует прямая корреляция силы кондиционирования с частотой возникновения и тяжестью РТПХ [3, 106].

Немиелоаблативный вид кондиционирования [132] не уничтожает полностью ни здоровую кроветворную кровь пациента, ни трансформированный клон. Этот режим кондиционирования обеспечивает подавление кроветворения пациента и высвобождение гемопоэтических ниш, в то время как окончательная элиминация лейкозных клеток обеспечивается за счет эффекта РТПО [25]. В этом случае снижается степень повреждения здоровых тканей и уменьшается частота развития тяжелых форм РТПХ [80].

В ряде работ было показано, что временного и частичного химеризма (с последующим отторжением трансплантата) может быть достаточно для индукции противоопухолевого иммунитета. В этом случае провоспалительное окружение, созданное в результате кондиционирования, активирует Т-лимфоциты донора, которые успевают элиминировать опухолевый клон до того, как иммунная система реципиента отторгает трансплантат [98].

Кумулятивное повреждающее действие радиационного излучения, химиотерапии, первоначального злокачественного заболевания и сопутствующих инфекционных осложнений вызывает апоптоз здоровых клеток, особенно в быстро обновляющихся тканях, таких как слизистая ЖКТ, что приводит к резкому всплеску секреции провоспалительных молекул, называемому «цитокиновым штормом». Повышается секреция таких цитокинов, как TNF и IL-1, IL-6, GM-CSF [85, 130].

Также на поверхности клеток увеличивается экспрессия молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1 [39, 47, 92] и молекул главного комплекса гистосовместимости, что дополнительно увеличивает вероятность презентации реципиент-специфических антигенов и их иммунного распознавания.

В тех случаях, когда перед трансфузией проводится полная или частичная деплеция $\alpha\beta$ Т-лимфоцитов в трансплантате, а затем уже после стихания воспалительной реакции, индуцированной кондиционированием, проводится дополнительная инфузия зрелых донорских лимфоцитов, существенно снижается частота развития оРТПХ [24, 79].

При применении кондиционирования с пониженной интенсивностью миелоидные дендритные клетки производят IL-12, который индуцирует дифференцировку CD4⁺Т-клеток в направлении Th1, которые, в свою очередь, за счет секреции IFN γ стимулируют деятельность макрофагов, что в конечном итоге приводит к активации каскадов передачи сигнала через TNF, IL-1 и IL-6 [85].

Также на частоту развития и тяжесть оРТПХ влияют полиморфизмы в генах, кодирующих цитокины. Так, наличие у пациентов ОНП, приводящего к увеличению экспрессии TNF усиливало тяжесть оРТПХ [23, 82]. Некоторые полиморфизмы в гене цитокина IL-1 реципиента усиливают степень оРТПХ [32], в то время как наличие определенных аллелей гена IL-1ra (антагонист IL-1) у донора связано со снижением тяжести РТПХ [32]. Другой провоспалительный цитокин – IL-6 – также может усиливать оРТПХ. Было показано, что полиморфизмы, ассоциированные с повышенной продукцией IL-6, стабильно ассоциированы с усилением оРТПХ [22, 63].

При этом определенный вклад вносят полиморфизмы в генах цитокинов и у донора за счет секреции цитокинов Т-клетками донора после трансплантации гемопоэтических клеток [108]. Соответственно, полиморфизмы в генах, кодирующих цитокины, нужно принимать во внимание при подборе донора для аллогенной трансплантации.

Учитывая ключевую роль формирования провоспалительного окружения в результате предтрансплантационной терапии, естественной

стратегией подавления РТПХ является воздействие на различные компоненты воспалительной реакции, вызванной кондиционированием. Однако клинические исследования моноклонального анти-TNF антитела инфликсимаба не показали эффективности в предотвращении РТПХ [50], а препарат рекомбинантного TNFR2, этанерцепт, имеет лишь ограниченную эффективность [27]. Также неэффективной оказалась и анти-IL-1 терапия [7].

В результате повреждения эпителия кишечника и других барьерных органов происходит проникновение нормальной микробиоты в подлежащие ткани. Продукты разрушения бактерий: липополисахарид (ЛПС), флагеллин, неметилированные CpG-мотивы, липотейхоевая кислота и пептидогликан, суммарно называемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, являются мощнейшими стимуляторами системы врожденного иммунитета. Toll- и NOD-подобные рецепторы на макрофагах через активацию транскрипционных факторов NF- κ B, AP-1 и IRF3 [107] запускают экспрессию широкого спектра провоспалительных генов, внося дополнительный вклад в формирование «цитокинового шторма» и развития оРТПХ. На мышинных моделях и в клинических исследованиях было показано, что мутации в гене TLR4, который кодирует рецептор ЛПС, снижают риск возникновения РТПХ, а связывание бактериальной ДНК с TLR9 способствует индукции острого РТПХ [94]. Одно из наиболее убедительных доказательств роли рецепторов врожденного иммунитета в инициации РТПХ было получено при нанесении активатора TLR7 на участок мышинной кожи перед индукцией РТПХ. Это приводит к сильной инфильтрации Т-клеток и развитию РТПХ исключительно в местах нанесения активатора.

Полиморфизмы в генах, кодирующих TLR4 и NOD-подобные рецепторы, связаны с повышенным риском возникновения РТПХ и, таким образом, вносят свой вклад в развитие РТПХ независимо от различий HLA-аллелям или минорным антигенам.

При этом на частоту возникновения и на протекание РТПХ оказывает влияние и качественный состав микрофлоры, что может быть использовано в профилактике осложнений после трансплантации [11, 59]. Соответственно, изменение состава кишечной микрофлоры таким образом, чтобы она в меньшей степени способствовала РТПХ, может быть одним из способов подавления РТПХ. На животных моделях было показано, что после введения пробиотических бактерий степень развития РТПХ уменьшалась, а общая выживаемость увеличивалась [26, 46].

В результате цитокинового шторма и передачи сигнала через систему врожденного имму-

нитета происходит активация АПК пациента, которые оказались устойчивы к повреждающему действию лучевой и/или химиотерапии. Под действием провоспалительного окружения происходит созревание АПК, которые захватывают аутоантигены из разрушенных клеток. Экспрессия рецепторов к провоспалительным хемокинам снижается, одновременно усиливается экспрессия рецепторов гомеостатических хемокинов, таких как CXCR4 и CCR7. Это и повышенная экспрессия адгезионных молекул: L-селектин, LFA-1 (α L β 2-интегрин) – приводит к миграции зрелых АПК в лимфоузлы. АПК экспрессируют на своей поверхности повышенное количество молекул МНС и костимуляторные молекулы.

Трансплантат не содержит зрелых АПК, поэтому основную роль в запуске оРТПХ играет презентация собственных антигенов антигенпрезентирующими клетками реципиента, перенесшими кондиционирование и активированными сигнальными молекулами из поврежденных тканей. оРТПХ в основном поражает богатые АПК органы (кишечник, кожа, печень, легкие). Также повышенной чувствительности к РТПХ вышеперечисленных тканей способствует тот факт, что эти ткани находятся на границе с внешней средой и, соответственно, их повреждение кондиционированием приводит к просачиванию микрофлоры, таким образом обеспечивая активацию рецепторов системы врожденного иммунитета и предоставляя через ось CD28/B7 необходимый для активации Т-лимфоцитов костимуляторный сигнал. На более поздних этапах может происходить захват и презентация антигенов реципиента АПК происходящими из трансплантата.

Как было отмечено выше, распознавание пептида в комплексе с МНС необходимо, но в большинстве случаев недостаточно для активации Т-лимфоцитов. Дополнительный стимул обеспечивается через взаимодействие с костимуляторными молекулами, экспрессируемыми на поверхности АПК [10]. Передача сигнала обеспечивается молекулами двух семейств: семейства рецептора TNF, а также суперсемейства иммуноглобулинов, включающего в себя B7/CD28, TIM и молекулы адгезии группы CD2.

Ключевые костимуляторные молекулы, которые присутствуют на активированных АПК – это B7.1 и B7.2 (CD80 и CD86), а также CD40. B7 связывается с CD28, представленной на мембране Т-лимфоцитов. Это взаимодействие является вторым сигналом, необходимым для запуска пролиферации и дифференцировки Т-клеток. CD40 связывается с CD40 лигандом (CD154), который находится на мембране Т-хелперов.

Наряду с активирующими существуют молекулы, передающие ингибиторный сигнал, и их уровень экспрессии меняется на разных стадиях

созревания клеток. Современем на поверхности активированных лимфоцитов начинается экспрессия молекулы CTLA-4, которая конкурирует с CD-28 за связывание с B7, подавляя активацию лимфоцитов. Активация Т-клетки подавляется ингибирующими молекулами PDL1 и PDL2, которые передают сигнал через специфический рецептор PD1. Специфические блокаторы CTLA-4 и PD1/PDL1 успешно применяются в терапии меланомы [1]. Таким образом, в ходе нормального иммунного ответа контролируется и своевременно подавляется эффекторное звено Т-клеточного ответа.

Костимуляторные молекулы являются перспективными мишенями для модуляции Т-клеточного ответа при трансплантации, несколько препаратов уже одобрены для клинического применения. В настоящий момент изучается применимость этого подхода в области профилактики и лечения оРТПХ.

2. Трансплантация аллогенных гемопоэтических клеток

На втором этапе патогенеза оРТПХ происходит активация Т-лимфоцитов донора, попавших в чужеродное и провоспалительное окружение. Кроме CD34⁺ клеток-предшественников, трансплантат содержит зрелые Т-лимфоциты.

В связи с этим одним из подходов к профилактике оРТПХ является модификация состава донорских клеток, вводимых пациенту. Так, полная деплеция $\alpha\beta$ Т-клеток при сохранении стволовых клеток существенно снижает частоту и интенсивность оРТПХ за счет отсутствия в трансплантате клеток специфичных к аллоантигенам. Однако из-за отсутствия клеточного звена иммунитета одновременно повышается вероятность отторжения трансплантата, частота развития вторичных инфекций, снижается эффект РТПО и, соответственно, увеличивается частота развития рецидива [71, 73].

Кроме полной $\alpha\beta$ деплеции существует другой подход. При помощи методов магнитной сепарации возможно селективно удалять отдельные типы Т-клеток, которые различаются по поверхностным маркерам [89]. Выделяют наивные, эффекторные Т-лимфоциты и клетки памяти, включающие в себя центральные клетки памяти и эффекторные клетки памяти, а также CD4⁺ и CD8⁺ регуляторные Т-клетки

Поскольку, за исключением случаев кросс-реактивности, клетки, специфичные к алло-антигенам, могут находиться только в популяции наивных Т-лимфоцитов, селективная деплеция наивных клеток может быть эффективным средством профилактики РТПХ. Данные, полученные в экспериментах на мышинных моделях, указывают на то, что трансфузия клеток памяти не вызывает или вызывает существенно более слабую РТПХ [5, 132]. В клинических экспериментах было подтверждено, что среди наивных

Т-клеток существенно больше клеток, специфичных к минорным антигенам, чем в популяции клеток памяти [16]. Тем не менее эксперименты по селективной деплеции наивных клеток не привели к существенному снижению оРТПХ [15] (достоверное снижение наблюдалось лишь для хронической формы РТПХ). Это может означать, что в данном случае развитие оРТПХ вызывалось клетками памяти.

К настоящему моменту существует инструментальная база для селективной модификации трансплантата, которая могла бы заключаться в специфической деплеции аутореактивных клонов и/или обогащения клонов, специфичных к антигенам гемопоэтической ткани для стимуляции противоопухолевого ответа. Современные методы магнитной селекции в сочетании с рекомбинантными мультимерами различных аллелей МНС, нагруженными конкретными пептидами, позволяют специфически выделить клоны Т-лимфоцитов, реагирующие на конкретные пептиды. Этот подход успешно применяется для адоптивного переноса вирус-специфических Т-лимфоцитов и для иммунотерапии солидных опухолей. Теоретически возможно удалить из трансплантата клетки, распознающие антигены, ответственные за РТПХ, но оставить клетки, специфичные к антигенам кроветворной ткани, и сохранить тем самым эффект РТПО. Однако отсутствие достоверной модели, позволяющей предсказывать потенциально иммуногенные минорные антигены в конкретных парах донор–реципиент, делает этот подход не применимым на сегодняшний день.

Содержащаяся в трансплантате противовоспалительная субпопуляция лимфоцитов – Т-регуляторные клетки – также оказывает влияние на развитие оРТПХ. Так, было показано, что высокое содержание этих клеток в трансплантате ассоциировано с пониженным риском острого РТПХ [76]. Однако в большинстве случаев концентрация регуляторных клеток в трансплантате оказывается недостаточной для предотвращения развития оРТПХ. Кроме того, под действием провоспалительного окружения регуляторные клетки могут приобретать провоспалительный фенотип, в частности переходить в Th17-субпопуляцию.

Уже через несколько часов после трансплантации Т-клетки донора мигрируют в лимфоузлы, где они встречают активированные АПК реципиента, презентующие алло-антигены. Различные возможные комбинации цитокинов на данной стадии способны направлять развитие Т-лимфоцитов по различным путям.

CD4⁺ клетки являются важными координаторами защитных реакций, через экспрессию мембранных и растворимых сигнальных молекул они регулируют дифференцировку и эффекторные

функции иммунных клеток. Спектр продуцируемых цитокинов определяется подтипом клеток. В популяции CD4⁺ различают два подтипа: Th1 и Th2, стимулирующих клеточный (макрофаги, цитотоксические лимфоциты) и гуморальный (В-клетки, эозинофилы) иммунитет.

Традиционно считается, что проявление РТПХ связано с Th1-опосредованным ответом [68, 119]. Дифференцировка Т-клеток в данном направлении запускается IL-12 с последующей экспрессией транскрипционного фактора T-bet через активацию транскрипционного фактора STAT4 [104]. Повышенное содержание Th1-ассоциированных цитокинов, TNF и IFN γ , коррелируют с более выраженным протеканием оРТПХ в модельных системах и клинических исследованиях. IFN γ в данном случае задействован в петле положительной обратной связи, так как усиливает развитие Th1-ответа. Помимо участия в регуляции, IFN γ оказывает непосредственный цитотоксический эффект на слизистую кишечника [20].

Th2-путь обычно рассматривают в качестве противоположного Th1. Дифференцировка в Th2 запускается в присутствии IL-25 и впоследствии поддерживается IL-4, в результате в них происходит активация транскрипционных факторов STAT6 и GATA3. Эффекторными цитокинами в данном случае выступают IL-4, IL-5, IL-10 и IL-13. Th2-путь обычно связан с более мягким течением РТПХ и его локализацией в тканях легкого, печени либо кожи, но не ЖКТ, что характерно для Th1. В недавних работах была обнаружена зависимость от IL-25 популяция клеток врожденного иммунитета, не несущая В- или Т-клеточного рецептора. При этом спектр секретлируемых этими клетками цитокинов соответствует Th2-пути. Исходя из указанных свойств, IL-25 обладает защитным в отношении ЖКТ эффектом, что может быть применимо в контексте развития РТПХ.

Кожная локализация также может быть обусловлена активностью Th17-клеток, хотя для них более характерно участие в развитии хронической РТПХ, которая протекает по другому механизму, больше схожее с аутоиммунными патологиями [62]. Дифференцировка в направлении Th17 проходит под действием IL-6, транскрипционный фактор ROR γ t запускается при активации STAT3, поддержание жизнеспособности и пролиферация обеспечиваются IL-23 и IL-21. В качестве эффекторных цитокинов выступают IL-17, IL-21 и IL-22 [109]. IL-21 может, кроме того, производиться фолликулярными Тh-клетками, этот цитокин способствует развитию РТПХ, нарушая гомеостаз регуляторных Т-клеток.

Другой, ассоциированный с Th1 цитокин, IL-2 также оказывает комплексное действие [67]. Изначально было известно о его способности стимулировать пролиферацию лимфоцитов, что применялось в терапии солидных опухолей [36].

Использование моноклональных антител против рецептора IL-2 (базиликсимаб) показало снижение оРТПХ как в модельных экспериментах, так и в клинике [81]. Для пациентов нечувствительных к терапии стероидами при оРТПХ (стадии III и IV) пятилетняя выживаемость составила 20% [43]. Базиликсимаб показал эффективность и у пациентов с неполной HLA-идентичностью донора, нечувствительных к терапии стероидами [125]. В то же время IL-2 играет роль и в поддержании популяции Т-регуляторных клеток и тем самым в подавлении РТПХ. По всей видимости, проявление этих двух противоположных эффектов зависит от концентрации цитокина и объясняется конкурентным связыванием с созревающими регуляторными и эффекторными Т-клетками [55].

Другие популяции Т-клеток, такие как $\gamma\delta$ Т-клетки и НК-клетки (естественные киллеры), также влияют на развитие РТПХ [83, 105].

Активированные в воспалительном окружении АПК реципиента направляются во вторичные лимфоидные органы, туда же вскоре после трансплантации мигрируют наивные Т-клетки донора. Однако при трансплантации кроветворных стволовых клеток роль вторичных лимфоидных органов не столь существенна, как в случае формирования нормального иммунного ответа. Поскольку аллоантигены экспрессируются повсеместно, любая активированная АПК представляет аллоантигены, а в случае несовпадений по генам HLA число предшественников аллореактивных Т-клеток необычайно высоко. Поэтому активация Т-клеток может успешно проходить и в других тканях, предположительно в костном мозге, что подтверждается экспериментами по индукции РТПХ на мышах без лимфатических узлов, в том числе в комбинации со спленэктомией [6, 111].

3. Эффекторная фаза оРТПХ

Завершающая (эффекторная) фаза патогенеза острой формы РТПХ включает в себя направленную миграцию активированных Т-клеток донора в органы-мишени и повреждение здоровых тканей реципиента через механизмы апоптоза и непрямого цитотоксичности. Аллореактивные Т-клетки секретуют в лимфоидных тканях INF, TNF и другие провоспалительные цитокины, которые попадают в кровоток и вместе с медиаторами воспаления, выделенными в кровоток поврежденными тканями, способствуют секреции провоспалительных хемокинов эндотелиальными и эпителиальными клетками в органах мишенях. Активированные Т-клетки мигрируют по градиентам концентрации хемокинов CXCL9, CXCL10 и CXCL11. Попав в органы мишени, Т-клетки, в свою очередь, секретуют хемокины: CCL3, CCL4, CCL5, которые продолжают привлекать

эффекторные Т-клетки, когда секреция хемокинов первой волны начинает спадать [129].

Пути миграции эффекторных Т-клеток зависят от рецепторов к хемокинам, которые они экспрессируют. Так, экспрессия хемокинового рецептора CCR9 аллореактивными Т-клетками способствует их миграции в кишечник и кожу, рецепторы CCR4 и CCR10 обуславливают попадание в кожу, а CXCR3 вызывает миграцию Th1 клеток в участки поврежденной ткани [113].

Перспективным направлением профилактики РТПХ является фармакологическая блокировка передачи сигналов через рецепторы хемокинов. У мышей, получавших инфузии CD8⁺ клеток с нарушенной функцией CCR2, наблюдалось менее выраженное повреждение кишечника и печени по сравнению с животными, получавшими CCR2⁺Т-клетки, в то же время экспрессия CCR2 не оказывала влияния на эффект РТПО [118]. Ингибирование CXCR3 также уменьшало степень выраженности РТПХ в мышечных моделях [52]. У пациентов было показано, что полиморфизмы CCR9 связаны со степенью выраженности РТПХ [57]. Однако использование антагонистов рецепторов хемокинов имеет не только положительный эффект, так как оно также может ингибировать миграцию регуляторных Т-клеток в органы, где развивается РТПХ [129]. Стероидная терапия, являющаяся на сегодняшний день стандартным компонентом профилактики и лечения РТПХ, оказывает влияние на уровни экспрессии сразу нескольких хемокинов, таких как CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCL2 и CCL3 [18].

Миграция эффекторных Т-клеток регулируется через взаимодействие между адгезионными молекулами и соответствующими им рецепторами на поверхности Т-лимфоцитов.

Одним из семейств молекул, участвующих в направленной миграции Т-лимфоцитов при РТПХ, являются селектины. Р-селектин, принадлежащий к семейству гликозилированных лектинов, конститутивно экспрессируется на поверхности эндотелия в сосудах, кожи и костном мозге и индуцируется на других клетках эндотелия во время воспаления [87].

Р-селектин необходим для обеспечения обратимых взаимодействий между эндотелием и Т-клетками. Уровни мРНК, кодирующей лиганд Р-селектина — PSGL1, повышаются в Т-клетках во время РТПХ [133]. У мышей, у которых отсутствует функционирующий Р-селектин, наблюдается менее выраженная по сравнению с контрольными реципиентами симптоматика оРТПХ в коже, печени и тонкой кишке. Это связано с пониженной миграцией Т-лимфоцитов в Пейеровы бляшки и тонкую кишку [75]. Блокирование взаимодействия селектина с его лигандом также может использоваться для ингибирования направленной миграции аллореактивных Т-клеток. Однако возможны побочные эффекты на противомикробный иммунитет [74].

Недавно появились работы в которых продемонстрирована важная роль интегринов при различных видах заболеваний связанных с воспалением, включая РТПХ. Высокий уровень тканевой специфичности интегринов делает их перспективными мишенями при терапии РТПХ. LРAM-1 ($\alpha_4\beta_7$ интегрин) определяют миграцию лимфоцитов в ЖКТ и ассоциированные с кишечником лимфоидные ткани [37, 100]. Было показано, что ингибирование β_7 интегрина в значительной степени подавляет кишечную форму оРТПХ не затрагивая РТПО [124]. Взаимодействия между $\alpha_1\beta_2$ / ICAM-1 способствуют миграции в легкое [93], $\alpha_1\beta_2$ / ICAM-1, 2, 3 — в печень [102], и $\alpha_4\beta_7$ / MadCAM-1 — в кишечник [117]. Селективные блокаторы интегринов уже применяются в лечении аутоиммунных заболеваний, антитело к α_4 интегрину (натализумаб) было недавно одобрено для лечения больных множественным склерозом [56].

Попадая в органы-мишени, Т-лимфоциты вызывают направленное повреждение тканей. Эффекторная стадия РТПХ реализуется в основном за счет CD8⁺ и CD4⁺ клеток, но, в принципе, может происходить и за счет НК-клеток (в случае несовпадения по HLA-локусам). В большинстве работ показано, что НК-клетки в основном способствуют эффекту РТПО и даже могут подавлять инициацию РТПХ за счет элиминации АПК реципиента [99].

CD8⁺ клетки реализуют свое токсическое действие за счет индукции апоптоза, однако в патогенезе идиопатической инфильтрация CD8⁺Т-клеток не сопряжена с индукцией апоптоза [20, 30].

Индукция апоптоза может происходить путем активации разных цитолитических каскадов, таких как Fas/FasL, перфорин и гранзимы, TNF (секретируемый моноцитами и макрофагами), TRAIL и TWEAK. В целом сигнальный путь Fas/FasL вносит больший вклад в развитие РТПХ, чем выброс перфорина и гранзимов [84], хотя в развитии нормального иммунного ответа именно каскад, запускаемый перфорином и гранзимами, участвует в иммунном ответе против внутриклеточных патогенов [61], тогда как Fas/FasL в основном используется в индукции апоптоза при регуляции иммунного ответа [88].

Кроме того, было показано, что индукция апоптоза в лейкемических клетках в основном происходит за счет перфорина и гранзимов в то время, как при РТПХ больше задействован Fas/FasL путь [103].

Было показано, что в РТПХ также могут быть задействованы альтернативные пути передачи проапоптотического сигнала, такие как через TNF и другие белки TNF-семейства: TRAIL и TWEAK [60].

В отличие от CD8⁺ клеток, которым необходимо непосредственное взаимодействие с клетками-мишенями, CD4⁺ клетки вносят свой вклад в патогенез РТПХ без прямого контакта с клетка-

ми за счет секреции цитокинов. Такие секретируемые цитокины, как TNF и IL-1, могут циркулировать в крови в больших концентрациях и иметь эндокринный эффект [120].

Кроме того, CD4⁺ клетки могут также индуцировать апоптоз как за счет активации Fas/FasL каскада, так и через секрецию перфорина и гранзимов [14].

Мононуклеарные фагоциты, активированные цитокинами, вырабатываемыми Th1-клетками и липополисахаридом, проникающим из поврежденных кондиционированием барьерных органов, также вносят свой вклад в развитие апоптоза благодаря секреции TNF и IL-6 [78]. Кроме своих мишеней – клеток гемопоэтического ряда – цитокины могут оказывать прямой эффект на негемопоэтические клетки. Пролиферативный эффект на фибробласты описан для цитокинов IFN γ , IL-2, IL-10 и TGF- β , в результате чего развивается фиброз [13].

Перспективным направлением профилактики оРТПХ является трансфузия Т-регуляторных клеток. Адоптивный перенос размноженных *in vitro* CD4⁺, CD25⁺Т-лимфоцитов приводит к снижению клинических симптомов РТПХ [19]. Инфузии Т-регуляторных клеток наиболее эффективны, когда производятся одновременно или вскоре после трансплантации. Однако такой метод профилактики РТПХ имеет ряд ограничений: для предотвращения отторжения Т-регуляторных клеток необходимо, чтобы они были почти или полностью совместимы по МНС, экспансия клеток *in vitro* затратна и занимает значительное время. В дополнение к этому, значительная часть клеток теряет эффективность при культивировании, а после инфузии под действием провоспалительных цитокинов Т-регуляторные клетки могут перейти в Th17-клеточный пул.

Другими иммунорегуляторными клетками, применяющимися для профилактики РТПХ, являются мезенхимные стромальные клетки. Они оказывают иммуносупрессивное действие как на Т-лимфоциты, так и на АПК. Клинические исследования продемонстрировали снижение РТПХ на фоне введения мезенхимных стромальных клеток [70, 110].

Список литературы / References

1. Боголюбова А.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Недоспасов С.А. Иммуноterapia опухолей, основанная на блокировке иммунологических контрольных «точек» («чекпойнтов») // Медицинская иммунология, 2015, Т. 17, № 5. С. 395-406. [Bogolyubova A.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Cancer immunotherapy based on the blockade of immune checkpoints. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 395-406. doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-395-406 (In Russ.)]
2. Alexandrov L.B., Nik-Zainal S., Wedge D.C., Aparicio S.A., Behjati S., Biankin A.V., Bignell G.R., Bolli N., Borg A., Borresen-Dale A.L., Boyault S., Burkhardt B., Butler A.P., Caldas C., Davies H.R., Desmedt C., Eils R., Eyfjord J.E., Foekens J.A., Greaves M., Hosoda F., Hutter B., Ilicic T., Imbeaud S., Imielinski M., Jager N., Jones D.T., Jones D., Knappskog S., Kool M., Lakhani S.R., Lopez-Otin C., Martin S., Munshi N.C., Nakamura H., Northcott P.A., Pajic M., Papaemmanuil E., Paradiso A., Pearson J.V., Puente X.S., Raine K., Ramakrishna M., Richardson A.L., Richter J., Rosenstiel P., Schlesner M., Schumacher T.N., Span P.N., Teague J.W., Totoki Y., Tutt A.N., Valdes-Mas R., van Buuren M.M., van 't Veer L., Vincent-Salomon A., Waddell N., Yates L.R., Australian I. Pancreatic Cancer

Заключение

Несмотря на успехи программ по созданию международных регистров доноров гемопоэтических стволовых клеток, острая форма РТПХ по-прежнему является главным лимитирующим фактором более широкого применения алло-ТГСК. Даже полное совпадение по генам HLA локуса не защищает от развития аллореактивности, поскольку в ее основе может лежать ответ на минорные антигены гистосовместимости. В настоящее время проводится большое количество предклинических и клинических исследований новых терапевтических и профилактических подходов, однако большинство из них не антиген-специфично и, как следствие, потенциально способно также подавлять и противоопухолевый эффект трансплантата.

Одним из подходов, который теоретически смог бы позволить предотвратить развитие РТПХ, не затрагивая эффекты РТПО, является селективная модификация трансплантата путем обогащения клеток, реагирующих на опухолевые (гемопоэтические) антигены реципиента и/или обеднения клеток, распознающих антигены здоровых тканей. Также перспективно использование адоптивного переноса клеток, несущих химерные антигенные рецепторы или трансгенные ТКР, специфичные к гемопоэтическим минорным антигенам реципиента. Для этого необходимо продолжать работы по поиску новых минорных антигенов гистосовместимости. Существующие на сегодняшний день технологии высокопроизводительного секвенирования позволяют относительно быстро получить информацию о всех генетических различиях между донором и реципиентом. Однако на данный момент невозможно достоверно предсказать, какие из несинонимичных полиморфизмов могут приводить к потенциально иммуногенным изменениям в иммунопептидоме. Накопленные экспериментальные и клинические данные должны послужить основой для создания алгоритмов предсказания минорных антигенов гистосовместимости для конкретных пар донор-реципиент, что, в свою очередь, может привести к созданию персонализированных терапевтических подходов.

Genome, I.B.C. Consortium, I. M.-S. Consortium, PedBrain I., Zucman-Rossi J., Futreal P.A., McDermott U., Lichter P., Meyerson M., Grimmer S.M., Siebert R., Campo E., Shibata T., Pfister S.M., Campbell P.J., Stratton M.R. Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature*, 2013, Vol. 500, pp. 415-421.

3. Alyea E.P., Kim H.T., Ho V., Cutler C., DeAngelo D.J., Stone R., Ritz J., Antin J.H., Soiffer R.J. Impact of conditioning regimen intensity on outcome of allogeneic hematopoietic cell transplantation for advanced acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2006, Vol. 12, pp. 1047-1055.

4. Anasetti C., Beatty P.G., Storb R., Martin P.J., Mori M., Sanders J.E., Thomas E.D., Hansen J.A. Effect of HLA incompatibility on graft-versus-host disease, relapse, and survival after marrow transplantation for patients with leukemia or lymphoma. *Hum. Immunol.*, 1990, Vol. 29, pp. 79-91.

5. Anderson B.E., McNiff J., Yan J., Doyle H., Mamula M., Shlomchik M.J., Shlomchik W.D. Memory CD4⁺ T cells do not induce graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.*, 2003, Vol. 112, pp. 101-108.

6. Anderson B.E., Taylor P.A., McNiff J.M., Jain D., Demetris A.J., Panoskaltis-Mortari A., Ager A., Blazar B.R., Shlomchik W.D., Shlomchik M.J. Effects of donor T-cell trafficking and priming site on graft-versus-host disease induction by naive and memory phenotype CD4 T cells. *Blood*, 2008, Vol. 111, pp. 5242-5251.

7. Antin J.H., Weisdorf D., Neuberg D., Nicklow R., Clouthier S., Lee S.J., Alyea E., McGarigle C., Blazar B.R., Sonis S., Soiffer R.J., Ferrara J.L. Interleukin-1 blockade does not prevent acute graft-versus-host disease: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial of interleukin-1 receptor antagonist in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood*, 2002, Vol. 100, pp. 3479-3482.

8. Atkins R.C., Ford W.L. Early cellular events in a systemic graft-vs.-host reaction. I. The migration of responding and nonresponding donor lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1975, Vol. 141, pp. 664-680.

9. Bassani-Sternberg M., Pletscher-Frankild S., Jensen L.J., Mann M. Mass spectrometry of human leukocyte antigen class I peptidomes reveals strong effects of protein abundance and turnover on antigen presentation. *Mol. Cell Proteomics*, 2015, Vol. 14, pp. 658-673.

10. Baxter A.G., Hodgkin P.D. Activation rules: the two-signal theories of immune activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 2, pp. 439-446.

11. Beelen D.W., Elmaagacli A., Muller K.D., Hirche H., Schaefer U.W. Influence of intestinal bacterial decontamination using metronidazole and ciprofloxacin or ciprofloxacin alone on the development of acute graft-versus-host disease after marrow transplantation in patients with hematologic malignancies: final results and long-term follow-up of an open-label prospective randomized trial. *Blood*, 1999, Vol. 93, pp. 3267-3275.

12. Bjorkman P.J., Saper M.A., Samraoui B., Bennett W.S., Strominger J.L., Wiley D.C. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature*, 1987, Vol. 329, pp. 506-512.

13. Blazar B.R., Murphy W.J., Abedi M. Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 443-458.

14. Blazar B.R., Taylor P.A., Valleria D.A. CD4⁺ and CD8⁺ T cells each can utilize a perforin-dependent pathway to mediate lethal graft-versus-host disease in major histocompatibility complex-disparate recipients. *Transplantation*, 1997, Vol. 64, pp. 571-576.

15. Bleakley M., Heimfeld S., Jones L.A., Turtle C., Krause D., Riddell S.R., Shlomchik W. Engineering human peripheral blood stem cell grafts that are depleted of naive T cells and retain functional pathogen-specific memory T cells. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2014, Vol. 20, pp. 705-716.

16. Bleakley M., Otterud B.E., Richardt J.L., Mollerup A.D., Hudecek M., Nishida T., Chaney C.N., Warren E.H., Leppert M.F., Riddell S.R. Leukemia-associated minor histocompatibility antigen discovery using T-cell clones isolated by *in vitro* stimulation of naive CD8⁺ T cells. *Blood*, 2010, Vol. 115, pp. 4923-4933.

17. Bleakley M., Riddell S.R. Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat. Rev. Cancer*, 2004, Vol. 4, pp. 371-380.

18. Bouazzaoui A., Spacenko E., Mueller G., Huber E., Schubert T., Holler E., Andreesen R., Hildebrandt G.C. Steroid treatment alters adhesion molecule and chemokine expression in experimental acute graft-vs.-host disease of the intestinal tract. *Exp. Hematol.*, 2011, Vol. 39, pp. 238-249 e231.

19. Brunstein C.G., Miller J.S., Cao Q., McKenna D.H., Hippen K.L., Curtsinger J., Defor T., Levine B.L., June C.H., Rubinstein P., McClave P.B., Blazar B.R., Wagner J.E. Infusion of *ex vivo* expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood*, 2011, Vol. 117, pp. 1061-1070.

20. Burman A.C., Banovic T., Kuns R.D., Clouston A.D., Stanley A.C., Morris E.S., Rowe V., Bofinger H., Skoczylas R., Raffelt N., Fahy O., McColl S.R., Engwerda C.R., McDonald K.P., Hill G.R. IFN γ differentially controls the development of idiopathic pneumonia syndrome and GVHD of the gastrointestinal tract. *Blood*, 2007, Vol. 110, pp. 1064-1072.

21. Cavazzana-Calvo M., Carlier F., Le Deist F., Morillon E., Taupin P., Gautier D., Radford-Weiss I., Caillaud-Zucman S., Neven B., Blanche S., Cheynier R., Fischer A., Hachein-Bey-Abina S. Long-term T-cell reconstitution after hematopoietic stem-cell transplantation in primary T-cell-immunodeficient patients is associated with myeloid chimerism and possibly the primary disease phenotype. *Blood*, 2007, Vol. 109, pp. 4575-4581.

22. Cavet J., Dickinson A.M., Norden J., Taylor P.R., Jackson G.H., Middleton P.G. Interferon-gamma and interleukin-6 gene polymorphisms associate with graft-versus-host disease in HLA-matched sibling bone marrow transplantation. *Blood*, 2001, Vol. 98, pp. 1594-1600.

23. Cavet J., Middleton P.G., Segall M., Noreen H., Davies S.M., Dickinson A.M. Recipient tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 gene polymorphisms associate with early mortality and acute graft-versus-host disease severity in HLA-matched sibling bone marrow transplants. *Blood*, 1999, Vol. 94, pp. 3941-3946.

24. Chakraverty R., Cote D., Buchli J., Cotter P., Hsu R., Zhao G., Sachs T., Pitsillides C.M., Bronson R., Means T., Lin C., Sykes M. An inflammatory checkpoint regulates recruitment of graft-versus-host reactive T cells to peripheral tissues. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, pp. 2021-2031.

25. Champlin R., Khouri I., Shimoni A., Gajewski J., Kornblau S., Mouldrem J., Ueno N., Giralt S., Anderlini P. Harnessing graft-versus-malignancy: non-myeloablative preparative regimens for allogeneic haematopoietic transplantation, an evolving strategy for adoptive immunotherapy. *Br. J. Haematol.*, 2000, Vol. 111, pp. 18-29.
26. Chen Y., Zhao Y., Cheng Q., Wu D., Liu H. The Role of Intestinal Microbiota in Acute Graft-versus-Host Disease. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, p. 145859.
27. Choi S.W., Reddy P. Current and emerging strategies for the prevention of graft-versus-host disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.*, 2014, Vol. 11, pp. 536-547.
28. Choo S.Y. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. *Yonsei Med. J.*, 2007, Vol. 48, pp. 11-23.
29. Chung W.H., Hung S.I., Hong H.S., Hsieh M.S., Yang L.C., Ho H.C., Wu J.Y., Chen Y.T. Medical genetics: a marker for Stevens-Johnson syndrome. *Nature*, 2004, Vol. 428, p. 486.
30. Cooke K.R. Acute lung injury after allogeneic stem cell transplantation: from the clinic, to the bench and back again. *Pediatr. Transplant.*, 2005, Vol. 9, Suppl. 7, pp. 25-36.
31. Crocchiolo R., Zino E., Vago L., Oneto R., Bruno B., Pollichieni S., Sacchi N., Sormani M.P., Marcon J., Lamparelli T., Fanin R., Garbarino L., Miotti V., Bandini G., Bosi A., Ciceri F., Bacigalupo A., Fleischhauer K., T.C. Gruppo Italiano Trapianto di Midollo Osseo and R. Italian Bone Marrow Donor. Nonpermissive HLA-DPB1 disparity is a significant independent risk factor for mortality after unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 2009, Vol. 114, pp. 1437-1444.
32. Cullup H., Dickinson A.M., Jackson G.H., Taylor P.R., Cavet J., Middleton P.G. Donor interleukin 1 receptor antagonist genotype associated with acute graft-versus-host disease in human leucocyte antigen-matched sibling allogeneic transplants. *Br. J. Haematol.*, 2001, Vol. 113, pp. 807-813.
33. Cullup H., Stark G. Interleukin-1 polymorphisms and graft-vs-host disease. *Leuk. Lymphoma*, 2005, Vol. 46, pp. 517-523.
34. D'Orsogna L.J., Nguyen T.H., Claas F.H., Witt C., Mifsud N.A. Endogenous-peptide-dependent alloreactivity: new scientific insights and clinical implications. *Tissue Antigens*, 2013, Vol. 81, pp. 399-407.
35. Danke N.A., Koelle D.M., Yee C., Beheray S., Kwok W.W. Autoreactive T cells in healthy individuals. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, pp. 5967-5972.
36. Dutcher J. Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. *Oncology (Williston Park)*, 2002, Vol. 16, pp. 4-10.
37. Dutt S., Ermann J., Tseng D., Liu Y.P., George T.I., Fathman C.G., Strober S. L-selectin and beta7 integrin on donor CD4 T cells are required for the early migration to host mesenteric lymph nodes and acute colitis of graft-versus-host disease. *Blood*, 2005, Vol. 106, pp. 4009-4015.
38. Dzierzak-Mietla M., Markiewicz M., Siekiera U., Mizia S., Koclega A., Zielinska P., Sobczyk-Kruszelnicka M., Kyrzcz-Krzemien S. Occurrence and Impact of Minor Histocompatibility Antigens' Disparities on Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Matched Sibling Donors. *Bone Marrow Res.*, 2012, Vol. 2012, p. 257086.
39. Eyrich M., Burger G., Marquardt K., Budach W., Schilbach K., Niethammer D., Schlegel P.G. Sequential expression of adhesion and costimulatory molecules in graft-versus-host disease target organs after murine bone marrow transplantation across minor histocompatibility antigen barriers. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2005, Vol. 11, pp. 371-382.
40. Ferrara J.L., Deeg H.J. Graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.*, 1991, Vol. 324, pp. 667-674.
41. Ferrara J.L., Levy R., Chao N.J. Pathophysiologic mechanisms of acute graft-vs.-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 1999, Vol. 5, pp. 347-356.
42. Fleischhauer K., Kernan N.A., O'Reilly R.J., Dupont B., Yang S.Y. Bone marrow-allograft rejection by T lymphocytes recognizing a single amino acid difference in HLA-B44. *N. Engl. J. Med.*, 1990, Vol. 323, pp. 1818-1822.
43. Funke V.A., de Medeiros C.R., Setubal D.C., Ruiz J., Bitencourt M.A., Bonfim C.M., Neto J.Z., Pasquini R. Therapy for severe refractory acute graft-versus-host disease with basiliximab, a selective interleukin-2 receptor antagonist. *Bone Marrow Transplant.*, 2006, Vol. 37, pp. 961-965.
44. Gale R.P., Horowitz M.M., Ash R.C., Champlin R.E., Goldman J.M., Rimm A.A., Ringden O., Stone J.A., Bortin M.M. Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Ann. Intern. Med.*, 1994, Vol. 120, pp. 646-652.
45. Garcia K.C., Degano M., Stanfield R.L., Brunmark A., Jackson M.R., Peterson P.A., Teyton L., Wilson I.A. An alphabeta T cell receptor structure at 2.5 Å and its orientation in the TCR-MHC complex. *Science*, 1996, Vol. 274, pp. 209-219.
46. Gerbitz A., Schultz M., Wilke A., Linde H.J., Scholmerich J., Andreesen R., Holler E. Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt. *Blood*, 2004, Vol. 103, pp. 4365-4367.
47. Gerhardt T., Ley K. Monocyte trafficking across the vessel wall. *Cardiovasc. Res.*, 2015, Vol. 107, pp. 321-330.
48. Glucksberg H., Storb R., Fefer A., Buckner C.D., Neiman P.E., Cliff R.A., Lerner K.G., Thomas E.D. Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors. *Transplantation*, 1974, Vol. 18, pp. 295-304.
49. Granados D.P., Sriranganadane D., Daouda T., Zieger A., Laumont C.M., Caron-Lizotte O., Boucher G., Hardy M.P., Gendron P., Cote C., Lemieux S., Thibault P., Perreault C. Impact of genomic polymorphisms on the repertoire of human MHC class I-associated peptides. *Nat. Commun.*, 2014, Vol. 5, pp. 3600.
50. Hamadani M., Hofmeister C.C., Jansak B., Phillips G., Elder P., Blum W., Penza S., Lin T.S., Klisovic R., Marcucci G., Farag S.S., Devine S.M. Addition of infliximab to standard acute graft-versus-host disease prophylaxis following allogeneic peripheral blood cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2008, Vol. 14, pp. 783-789.
51. Hambach L., Goulmy E. Immunotherapy of cancer through targeting of minor histocompatibility antigens. *Curr. Opin. Immunol.*, 2005, Vol. 17, pp. 202-210.

52. He S., Cao Q., Qiu Y., Mi J., Zhang J.Z., Jin M., Ge H., Emerson S.G., Zhang Y., Zhang Y.A. A new approach to the blocking of alloreactive T cell-mediated graft-versus-host disease by *in vivo* administration of anti-CXCR3 neutralizing antibody. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, pp. 7581-7592.
53. Heemskerk M.B., Cornelissen J.J., Roelen D.L., van Rood J.J., Claas F.H., Oudshoorn M. Highly diverged MHC class I mismatches are acceptable for haematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2007, Vol. 40, pp. 193-200.
54. Heemskerk M.B., van Walraven S.M., Cornelissen J.J., Barge R.M., Bredius R.G., Egeler R.M., Tj Lie J.L., Revezs T., Sintnicolaas K., Wulffraat N.M., Donker A.E., Hoogerbrugge P.M., van Rood J.J., Claas F.H., Oudshoorn M. How to improve the search for an unrelated haematopoietic stem cell donor. Faster is better than more! *Bone Marrow Transplant.*, 2005, Vol. 35, pp. 645-652.
55. Hofer T., Krichevsky O., Altan-Bonnet G. Competition for IL-2 between Regulatory and Effector T Cells to Chisel Immune Responses. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 268.
56. Hutchinson M. Natalizumab: A new treatment for relapsing remitting multiple sclerosis. *Ther. Clin. Risk Manag.*, 2007, Vol. 3, pp. 259-268.
57. Inamoto Y., Murata M., Katsumi A., Kuwatsuka Y., Tsujimura A., Ishikawa Y., Sugimoto K., Onizuka M., Terakura S., Nishida T., Kanie T., Tajiri H., Iida H., Suzuki R., Abe A., Kiyoi H., Matsushita T., Miyamura K., Kodera Y., Naoe T. Donor single nucleotide polymorphism in the CCR9 gene affects the incidence of skin GVHD. *Bone Marrow Transplant.*, 2010, Vol. 45, pp. 363-369.
58. Israeli M., Roelen D.L., Carrington M., Petersdorf E.W., Claas F.H., Haasnoot G.W., Oudshoorn M. Association between CTL Precursor Frequency to HLA-C Mismatches and HLA-C Antigen Cell Surface Expression. *Front. Immunol.*, 2014, Vol. 5, pp. 547.
59. Jenq R.R., Ubeda C., Taur Y., Menezes C.C., Khanin R., Dudakov J.A., Liu C., West M.L., Singer N.V., Equinda M.J., Gobourne A., Lipuma L., Young L.F., Smith O.M., Ghosh A., Hanash A.M., Goldberg J.D., Aoyama K., Blazar B.R., Pamer E.G., van den Brink M.R. Regulation of intestinal inflammation by microbiota following allogeneic bone marrow transplantation. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, pp. 903-911.
60. Jiang Z., Podack E., Levy R.B. Major histocompatibility complex-mismatched allogeneic bone marrow transplantation using perforin and/or Fas ligand double-defective CD4(+) donor T cells: involvement of cytotoxic function by donor lymphocytes prior to graft-versus-host disease pathogenesis. *Blood*, 2001, Vol. 98, pp. 390-397.
61. Kagi D., Ledermann B., Burki K., Seiler P., Odermatt B., Olsen K.J., Podack E.R., Zinkernagel R.M., Hengartner H. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. *Nature*, 1994, Vol. 369, pp. 31-37.
62. Kappel L.W., Goldberg G.L., King C.G., Suh D.Y., Smith O.M., Ligh C., Holland A.M., Grubin J., Mark N.M., Liu C., Iwakura Y., Heller G., van den Brink M.R. IL-17 contributes to CD4-mediated graft-versus-host disease. *Blood*, 2009, Vol. 113, pp. 945-952.
63. Karabon L., Wysoczanska B., Bogunia-Kubik K., Suchnicki K., Lange A. IL-6 and IL-10 promoter gene polymorphisms of patients and donors of allogeneic sibling hematopoietic stem cell transplants associate with the risk of acute graft-versus-host disease. *Hum. Immunol.*, 2005, Vol. 66, pp. 700-710.
64. Kawase T., Morishima Y., Matsuo K., Kashiwase K., Inoko H., Saji H., Kato S., Juji T., Kodera Y., Sasazuki T., Japan Marrow Donor P. High-risk HLA allele mismatch combinations responsible for severe acute graft-versus-host disease and implication for its molecular mechanism. *Blood*, 2007, Vol. 110, pp. 2235-2241.
65. Keever C.A., Leong N., Cunningham I., Copelan E.A., Avalos B.R., Klein J., Kapoor N., Adams P.W., Orosz C.G., Tutschka P.J. HLA-B44-directed cytotoxic T cells associated with acute graft-versus-host disease following unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 1994, Vol. 14, pp. 137-145.
66. Kekre N., Antin J.H. Hematopoietic stem cell transplantation donor sources in the 21st century: choosing the ideal donor when a perfect match does not exist. *Blood*, 2014, Vol. 124, pp. 334-343.
67. Koreth J., Matsuoka K., Kim H.T., McDonough S.M., Bindra B., Alyea E.P., Armand P., Cutler C., Ho V.T., Treister N.S., Bienfang D.C., Prasad S., Tzachanis D., Joyce R.M., Avigan D.E., Antin J.H., Ritz J., Soiffer R.J. Interleukin-2 and regulatory T cells in graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.*, 2011, Vol. 365, pp. 2055-2066.
68. Krenge W., Ferrara J.L. Graft-versus-host disease and the Th1/Th2 paradigm. *Immunol. Res.*, 1996, Vol. 15, pp. 50-73.
69. Kumanovics A., Takada T., Lindahl K.F. Genomic organization of the mammalian MHC. *Annu Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 629-657.
70. Kuzmina L.A., Petinati N.A., Shipounova I.N., Sats N.V., Bigildeev A.E., Zezina E.A., Popova M.D., Drize N.J., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Analysis of multipotent mesenchymal stromal cells used for acute graft-versus-host disease prophylaxis. *Eur. J. Haematol.*, 2015.
71. Lang P., Teltschik H.M., Feuchtinger T., Muller I., Pfeiffer M., Schumm M., Ebinger M., Schwarze C.P., Gruhn B., Schrauder A., Albert M.H., Greil J., Urban C., Handgretinger R. Transplantation of CD3/CD19 depleted allografts from haploidentical family donors in paediatric leukaemia. *Br. J. Haematol.*, 2014, Vol. 165, pp. 688-698.
72. Lee S.J., Klein J., Haagenson M., Baxter-Lowe L.A., Confer D.L., Eapen M., Fernandez-Vina M., Flomenberg N., Horowitz M., Hurley C.K., Noreen H., Oudshoorn M., Petersdorf E., Setterholm M., Spellman S., Weisdorf D., Williams T.M., Anasetti C. High-resolution donor-recipient HLA matching contributes to the success of unrelated donor marrow transplantation. *Blood*, 2007, Vol. 110, pp. 4576-4583.
73. Lee Y.J., Chung D., Xiao K., Papadopoulos E.B., Barker J.N., Small T.N., Giralt S.A., Jakubowski A.A., Papanicolaou G.A. Adenovirus viremia and disease: comparison of T cell-depleted and conventional hematopoietic stem cell transplantation recipients from a single institution. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2013, Vol. 19, pp. 387-392.
74. Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol. Med.*, 2003, Vol. 9, pp. 263-268.
75. Lu S.X., Holland A.M., Na I.K., Terwey T.H., Alpdogan O., Bautista J.L., Smith O.M., Suh D., King C., Kochman A., Hubbard V.M., Rao U.K., Yim N., Liu C., Laga A.C., Murphy G., Jenq R.R., Zakrzewski J.L., Penack O.,

Dykstra L., Bampoe K., Perez L., Furie B., Furie B., van den Brink M.R. Absence of P-selectin in recipients of allogeneic bone marrow transplantation ameliorates experimental graft-versus-host disease. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, pp. 1912-1919.

76. Lu S.Y., Liu K.Y., Liu D.H., Xu L.P., Huang X.J. High frequencies of CD62L(+) naive regulatory T cells in allografts are associated with a low risk of acute graft-versus-host disease following unmanipulated allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Clin. Exp. Immunol.*, 2011, Vol. 165, pp. 264-277.

77. Ma J.D., Lee K.C., Kuo G.M. HLA-B*5701 testing to predict abacavir hypersensitivity. *PLoS Curr.*, 2010, Vol. 2, p. RRN1203.

78. Mantovani A., Sica A., Sozzani S., Allavena P., Vecchi A., Locati M. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, pp. 677-686.

79. Mapara M.Y., Kim Y.M., Wang S.P., Bronson R., Sachs D.H., Sykes M. Donor lymphocyte infusions mediate superior graft-versus-leukemia effects in mixed compared to fully allogeneic chimeras: a critical role for host antigen-presenting cells. *Blood*, 2002, Vol. 100, pp. 1903-1909.

80. Maris M.B., Niederwieser D., Sandmaier B.M., Storer B., Stuart M., Maloney D., Petersdorf E., McSweeney P., Pulsipher M., Woolfrey A., Chauncey T., Agura E., Heimfeld S., Slattery J., Hegenbart U., Anasetti C., Blume K., Storb R. HLA-matched unrelated donor hematopoietic cell transplantation after nonmyeloablative conditioning for patients with hematologic malignancies. *Blood*, 2003, Vol. 102, pp. 2021-2030.

81. Massenkeil G., Rackwitz S., Genvresse I., Rosen O., Dorken B., Arnold R. Basiliximab is well tolerated and effective in the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 2002, Vol. 30, pp. 899-903.

82. Middleton P.G., Taylor P.R., Jackson G., Proctor S.J., Dickinson A.M. Cytokine gene polymorphisms associating with severe acute graft-versus-host disease in HLA-identical sibling transplants. *Blood*, 1998, Vol. 92, pp. 3943-3948.

83. Minculescu L., Sengelov H. The role of gamma delta T cells in haematopoietic stem cell transplantation. *Scand. J. Immunol.*, 2015, Vol. 81, pp. 459-468.

84. Miwa K., Hashimoto H., Yatomi T., Nakamura N., Nagata S., Suda T. Therapeutic effect of an anti-Fas ligand mAb on lethal graft-versus-host disease. *Int. Immunol.*, 1999, Vol. 11, pp. 925-931.

85. Mohty M., Blaise D., Faucher C., Vey N., Bouabdallah R., Stoppa A.M., Viret F., Gravis G., Olive D., Gaugler B. Inflammatory cytokines and acute graft-versus-host disease after reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation. *Blood*, 2005, Vol. 106, pp. 4407-4411.

86. Morris G.P., Uy G.L., Donermeyer D., Dipersio J.F., Allen P.M. Dual receptor T cells mediate pathologic alloreactivity in patients with acute graft-versus-host disease. *Sci Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, p. 188ra174.

87. Muller W.A. Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.*, 2003, Vol. 24, pp. 327-334.

88. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*, 1997, Vol. 88, pp. 355-365.

89. Naik S., Heslop H.E. Engineering haploidentical transplants. *Bone Marrow Transplant.*, 2015, Vol. 50, no. 7, pp. 884-885.

90. Ng P.C., Henikoff S. Predicting the effects of amino acid substitutions on protein function. *Annu Rev. Genomics Hum. Genet.*, 2006, Vol. 7, pp. 61-80.

91. Ni P.P., Solomon B., Hsieh C.S., Allen P.M., Morris G.P. The ability to rearrange dual TCRs enhances positive selection, leading to increased Allo- and Autoreactive T cell repertoires. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 193, pp. 1778-1786.

92. Norton J., al-Saffar N., Sloane J.P. Adhesion molecule expression in human hepatic graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant.*, 1992, Vol. 10, pp. 153-156.

93. Panoskaltis-Mortari A., Hermanson J.R., Haddad I.Y., Wangenstein O.D., Blazar B.R. Intercellular adhesion molecule-I (ICAM-I, CD54) deficiency segregates the unique pathophysiological requirements for generating idiopathic pneumonia syndrome (IPS) versus graft-versus-host disease following allogeneic murine bone marrow transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2001, Vol. 7, pp. 368-377.

94. Penack O., Holler E., van den Brink M.R. Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood*, 2010, Vol. 115, pp. 1865-1872.

95. Petersdorf E.W., Gooley T.A., Malkki M., Bacigalupo A.P., Cesbron A., Du Toit E., Ehninger G., Egeland T., Fischer G.F., Gervais T., Haagenson M.D., Horowitz M.M., Hsu K., Jindra P., Madrigal A., Oudshoorn M., Ringden O., Schroeder M.L., Spellman S.R., Tiercy J.M., Velardi A., Witt C.S., O'Huigin C., Apps R., Carrington M. International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell. HLA-C expression levels define permissible mismatches in hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2014, Vol. 124, pp. 3996-4003.

96. Raiola A.M., Dominiotto A., di Grazia C., Lamparelli T., Gualandi F., Ibatici A., Bregante S., Van Lint M.T., Varaldo R., Ghiso A., Gobbi M., Carella A.M., Signori A., Galaverna F., Bacigalupo A. Unmanipulated haploidentical transplants compared with other alternative donors and matched sibling grafts. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2014, Vol. 20, pp. 1573-1579.

97. Ramshaw H.S., Crittenden R.B., Dooner M., Peters S.O., Rao S.S., Quesenberry P.J. High levels of engraftment with a single infusion of bone marrow cells into normal unprepared mice. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 1995, Vol. 1, pp. 74-80.

98. Rubio M.T., Kim Y.M., Sachs T., Mapara M., Zhao G., Sykes M. Antitumor effect of donor marrow graft rejection induced by recipient leukocyte infusions in mixed chimeras prepared with nonmyeloablative conditioning: critical role for recipient-derived IFN-gamma. *Blood*, 2003, Vol. 102, pp. 2300-2307.

99. Ruggeri L., Capanni M., Urbani E., Perruccio K., Shlomchik W.D., Tosti A., Posati S., Rogaia D., Frassoni F., Aversa F., Martelli M.F., Velardi A. Effectiveness of donor natural killer cell alloreactivity in mismatched hematopoietic transplants. *Science*, 2002, Vol. 295, pp. 2097-2100.

100. Sackstein R.A. A revision of Billingham's tenets: the central role of lymphocyte migration in acute graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2006, Vol. 12, pp. 2-8.
101. Sarantopoulos S., Blazar B.R., Cutler C., Ritz J. B cells in chronic graft-versus-host disease. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2015, Vol. 21, pp. 16-23.
102. Schiltz P.M., Giorno R.C., Claman H.N. Increased ICAM-1 expression in the early stages of murine chronic graft-versus-host disease. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 1994, Vol. 71, pp. 136-141.
103. Schmaltz C., Alpdogan O., Horndasch K.J., Muriglan S.J., Kappel B.J., Teshima T., Ferrara J.L., Burakoff S.J., van den Brink M.R. Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood*, 2001, Vol. 97, pp. 2886-2895.
104. Schmitt N., Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr. Opin. Immunol.*, 2015, Vol. 34, pp. 130-136.
105. Schneidawind D., Pierini A., Negrin R.S. Regulatory T cells and natural killer T cells for modulation of GVHD following allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood*, 2013, Vol. 122, pp. 3116-3121.
106. Scott B.L., Sandmaier B.M. Outcomes with myeloid malignancies. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program.*, 2006, Vol., pp. 381-389.
107. Sellge G., Kufer T.A. PRR-signaling pathways: Learning from microbial tactics. *Semin. Immunol.*, 2015, Vol. 27, pp. 75-84.
108. Serody J.S., Burkett S.E., Panoskaltis-Mortari A., Ng-Cashin J., McMahon E., Matsushima G.K., Lira S.A., Cook D.N., Blazar B.R. T-lymphocyte production of macrophage inflammatory protein-1 α is critical to the recruitment of CD8(+) T cells to the liver, lung, and spleen during graft-versus-host disease. *Blood*, 2000, Vol. 96, pp. 2973-2980.
109. Serody J.S., Hill G.R. The IL-17 differentiation pathway and its role in transplant outcome. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2012, Vol. 18, pp. S56-61.
110. Shipounova I.N., Petinati N.A., Bigildeev A.E., Zezina E.A., Drize N.I., Kuzmina L.A., Parovichnikova E.N., Savchenko V.G. Analysis of results of acute graft-versus-host disease prophylaxis with donor multipotent mesenchymal stromal cells in patients with hemoblastoses after allogeneic bone marrow transplantation. *Biochemistry (Mosc.)*, 2014, Vol. 79, pp. 1363-1370.
111. Silva I.A., Olkiewicz K., Askew D., Fisher J.M., Chaudhary M.N., Vannella K.M., Deurloo D.T., Choi S.W., Pierce E.M., Clouthier S.G., Liu C., Cooke K.R. Secondary lymphoid organs contribute to, but are not required for the induction of graft-versus-host responses following allogeneic bone marrow transplantation: a shifting paradigm for T cell allo-activation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2010, Vol. 16, pp. 598-611.
112. Spierings E., Kim Y.H., Hendriks M., Borst E., Sergeant R., Canossi A., Oudshoorn M., Loiseau P., Dolstra H., Markiewicz M., Leffell M.S., Pereira N., Kircher B., Turpeinen H., Eliaou J.F., Gervais T., Laurin D., Enczmann J., Martinetti M., Thomson J., Oguz F., Santarone S., Partanen J., Siekiera U., Alessandrino E.P., Kalayoglu S., Brand R., Goulmy E. Multicenter analyses demonstrate significant clinical effects of minor histocompatibility antigens on GvHD and GvL after HLA-matched related and unrelated hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2013, Vol. 19, pp. 1244-1253.
113. Steinmetz O.M., Turner J.E., Paust H.J., Lindner M., Peters A., Heiss K., Velden J., Hopfer H., Fehr S., Krieger T., Meyer-Schwesinger C., Meyer T.N., Helmchen U., Mittrucker H.W., Stahl R.A., Panzer U. CXCR3 mediates renal Th1 and Th17 immune response in murine lupus nephritis. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, pp. 4693-4704.
114. Stewart F.M., Crittenden R.B., Lowry P.A., Pearson-White S., Quesenberry P.J. Long-term engraftment of normal and post-5-fluorouracil murine marrow into normal nonmyeloablated mice. *Blood*, 1993, Vol. 81, pp. 2566-2571.
115. Strawbridge A.B., Blum J.S. Autophagy in MHC class II antigen processing. *Curr. Opin. Immunol.*, 2007, Vol. 19, pp. 87-92.
116. Sureda A., Bader P., Cesaro S., Dreger P., Duarte R.F., Dufour C., Falkenburg J.H., Farge-Bancel D., Gennery A., Kroger N., Lanza F., Marsh J.C., Nagler A., Peters C., Velardi A., Mohty M., Madrigal A. Indications for allo- and auto-SCT for haematological diseases, solid tumours and immune disorders: current practice in Europe, 2015. *Bone Marrow Transplant.*, 2015, Vol. 50, pp. 1037-1056.
117. Tanaka T., Ohtsuka Y., Yagita H., Shiratori Y., Omata M., Okumura K. Involvement of alpha 1 and alpha 4 integrins in gut mucosal injury of graft-versus-host disease. *Int. Immunol.*, 1995, Vol. 7, pp. 1183-1189.
118. Terwey T.H., Kim T.D., Kochman A.A., Hubbard V.M., Lu S., Zakrzewski J.L., Ramirez-Montagut T., Eng J.M., Muriglan S.J., Heller G., Murphy G.F., Liu C., Budak-Alpdogan T., Alpdogan O., van den Brink M.R. CCR2 is required for CD8-induced graft-versus-host disease. *Blood*, 2005, Vol. 106, pp. 3322-3330.
119. Teshima T., Maeda Y., Ozaki K. Regulatory T cells and IL-17-producing cells in graft-versus-host disease. *Immunotherapy*, 2011, Vol. 3, pp. 833-852.
120. Teshima T., Ordemann R., Reddy P., Gagin S., Liu C., Cooke K.R., Ferrara J.L. Acute graft-versus-host disease does not require alloantigen expression on host epithelium. *Nat. Med.*, 2002, Vol. 8, pp. 575-581.
121. Thomas E.D., Buckner C.D., Banaji M., Clift R.A., Fefer A., Flournoy N., Goodell B.W., Hickman R.O., Lerner K.G., Neiman P.E., Sale G.E., Sanders J.E., Singer J., Stevens M., Storb R., Weiden P.L. One hundred patients with acute leukemia treated by chemotherapy, total body irradiation, and allogeneic marrow transplantation. *Blood*, 1977, Vol. 49, pp. 511-533.
122. Valdor R., Macian F. Induction and stability of the anergic phenotype in T cells. *Semin. Immunol.*, 2013, Vol. 25, pp. 313-320.
123. Vincent K., Roy D.C., Perreault C. Next-generation leukemia immunotherapy. *Blood*, 2011, Vol. 118, pp. 2951-2959.
124. Waldman E., Lu S.X., Hubbard V.M., Kochman A.A., Eng J.M., Terwey T.H., Muriglan S.J., Kim T.D., Heller G., Murphy G.F., Liu C., Alpdogan O., van den Brink M.R. Absence of beta7 integrin results in less graft-

versus-host disease because of decreased homing of alloreactive T cells to intestine. *Blood*, 2006, Vol. 107, pp. 1703-1711.

125. Wang J.Z., Liu K.Y., Xu L.P., Liu D.H., Han W., Chen H., Chen Y.H., Zhang X.H., Zhao T., Wang Y., Huang X.J. Basiliximab for the treatment of steroid-refractory acute graft-versus-host disease after unmanipulated HLA-mismatched/haploidentical hematopoietic stem cell transplantation. *Transplant. Proc.*, 2011, Vol. 43, pp. 1928-1933.

126. Warlick E.D., Peffault de Latour R., Shanley R., Robin M., Bejanyan N., Xhaard A., Brunstein C., Sicre de Fontbrune F., Ustun C., Weisdorf D.J., Socie G. Allogeneic hematopoietic cell transplantation outcomes in acute myeloid leukemia: similar outcomes regardless of donor type. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2015, Vol. 21, pp. 357-363.

127. Wilson N.S., Villadangos J.A. Regulation of antigen presentation and cross-presentation in the dendritic cell network: facts, hypothesis, and immunological implications. *Adv. Immunol.*, 2005, Vol. 86, pp. 241-305.

128. Wysocki C.A., Jiang Q., Panoskaltis-Mortari A., Taylor P.A., McKinnon K.P., Su L., Blazar B.R., Serody J.S. Critical role for CCR5 in the function of donor CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells during acute graft-versus-host disease. *Blood*, 2005, Vol. 106, pp. 3300-3307.

129. Wysocki C.A., Panoskaltis-Mortari A., Blazar B.R., Serody J.S. Leukocyte migration and graft-versus-host disease. *Blood*, 2005, Vol. 105, pp. 4191-4199.

130. Xun C.Q., Thompson J.S., Jennings C.D., Brown S.A., Widmer M.B. Effect of total body irradiation, busulfan-cyclophosphamide, or cyclophosphamide conditioning on inflammatory cytokine release and development of acute and chronic graft-versus-host disease in H-2-incompatible transplanted SCID mice. *Blood*, 1994, Vol. 83, pp. 2360-2367.

131. Zhang L., Zhang Y.Z. Reduced-intensity conditioning allogeneic stem cell transplantation in malignant lymphoma: current status. *Cancer Biol. Med.*, 2013, Vol. 10, pp. 1-9.

132. Zheng H., Matte-Martone C., Li H., Anderson B.E., Venketesan S., Sheng Tan H., Jain D., McNiff J., Shlomchik W.D. Effector memory CD4⁺ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease. *Blood*, 2008, Vol. 111, pp. 2476-2484.

133. Zhou L., Askew D., Wu C., Gilliam A.C. Cutaneous gene expression by DNA microarray in murine sclerodermatous graft-versus-host disease, a model for human scleroderma. *J. Invest. Dermatol.*, 2007, Vol. 127, pp. 281-292.

134. Zino E., Frumento G., Markt S., Sormani M.P., Ficari, Di Terlizzi S., Parodi A.M., Sergeant R., Martinetti M., Bontadini A., Bonifazi F., Lisini D., Mazzi B., Rossini S., Servida P., Ciceri F., Bonini C., Lanino E., Bandini G., Locatelli F., Apperley J., Bacigalupo A., Ferrara G.B., Bordignon C., Fleischhauer K. A T-cell epitope encoded by a subset of HLA-DPB1 alleles determines nonpermissive mismatches for hematologic stem cell transplantation. *Blood*, 2004, Vol. 103, pp. 1417-1424.

Авторы:

Ефимов Г.А. — к.б.н., заведующий лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Вдовин А.С. — научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Григорьев А.А. — к.б.н, научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Филькин С.Ю. — научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Быкова Н.А. — научный сотрудник лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Савченко В.Г. — д.м.н., профессор, академик РАН, генеральный директор ФГБУ «Гематологический научный центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Efimov G.A., PhD (Biology), Chief, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Vdovin A.S., Research Associate, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Grigoryev A.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Filkin S.Yu., Research Associate, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Bykova N.A., Research Associate, Laboratory of Transplantation Immunology, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Savchenko V.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member of Russian Academy of Sciences, Director General, National Research Center for Hematology, Moscow, Russian Federation

Поступила 22.09.2015
Принята к печати 04.10.2015

Received 22.09.2015
Accepted 04.10.2015

МЕХАНИЗМ ВЛИЯНИЯ МЕЛАТОНИНА НА ИММУННЫЙ СТАТУС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ В УСЛОВИЯХ СВЕТОДИОДНОГО ОСВЕЩЕНИЯ

Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И.

ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Резюме. Раствор мелатонина в изотоническом растворе NaCl готовили из препарата «Мелаксен» (МНН: мелатонин, «Юнифарм Инк.», США) *ex tempore*. Для исследования врожденного иммунитета в крови общепринятыми методами определяли количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и функциональную активность фагоцитов по показателям спонтанного и индуцированного НСТ-теста и поглощению частиц монодисперсного полистирольного латекса. Th1-зависимый иммунный ответ исследовали по интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа, Th2-зависимый иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток в селезенке после иммунизации аллогенными эритроцитами.

Методом иммуноферментного анализа на аппарате «Иммулайт 2000» (США) определяли в сыворотке концентрацию интерлейкина-4 (IL-4), интерферона-гамма (IFN γ), мелатонина, кортизола с помощью специфичных для морских свинок тест-систем. Установлено, что при экспериментальном десинхронозе наблюдается нейтрофильный лейкоцитоз, лимфоцитопения и моноцитопения, активация кислород-зависимого метаболизма фагоцитов в периферической крови, подавление Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа. Десинхроноз сопровождается снижением концентрации в сыворотке мелатонина, IFN γ и IL-4, повышением концентрации кортизола. Снижение концентрации IFN γ и IL-4 ассоциировано со снижением концентрации мелатонина, а угнетение Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа прогрессирует по мере снижения уровня IFN γ и IL-4 соответственно. Применение при десинхронозе мелатонина в суммарной дозе 30 мг/кг приводит к восстановлению количественного состава лейкоцитов в периферической крови, генерации АФК фагоцитами, выраженности Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа, концентрации кортизола, IFN γ и IL-4 в сыворотке, а также стимулирует поглотительную способность фагоцитов в крови. Восстановление Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа ассоциировано с нормализацией концентрации IFN γ и IL-4 в сыворотке соответственно.

Ключевые слова: мелатонин, десинхроноз, врожденный и адаптивный иммунитет, цитокины

Адрес для переписки:

*Гизингер Оксана Анатольевна
ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64. кв. 320.
Тел.: 8 (919) 319-46-04.
E-mail: OGizinger@gmail.com*

Address for correspondence:

*Gizinger Oksana A.
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovsky str., 64,
apt 320.
Phone: 7 (919) 319-46-04.
E-mail: OGizinger@gmail.com*

Образец цитирования:

М.В. Осиков, О.А. Гизингер, О.И. Огнева, «Механизм влияния мелатонина на иммунный статус при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного освещения» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 517-524. doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-517-524

© Осиков М.В. и соавт., 2015

For citation:

M.V. Osikov, O.A. Gizinger, O.I. Ogneva, "Mechanisms of melatonin effects upon immune state in experimental desynchronoses produced under the LED illumination conditions", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 517-524. doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-517-524

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-517-524>

MECHANISMS OF MELATONIN EFFECTS UPON IMMUNE STATE IN EXPERIMENTAL DESYNCHRONOSES PRODUCED UNDER THE LED ILLUMINATION CONDITIONS

Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I.

South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Disorders of immune state in desynchronosis may be associated with reduced concentrations of melatonin in blood, thus being a prerequisite for pharmacological correction of appropriate homeostatic changes. The purpose of this work was to explore some mechanisms of exogenous melatonin actions upon parameters of innate and adaptive immunity in experimental model of desynchronosis under the conditions of LED illumination. The study was performed with 196 adult guinea pigs. Light desynchronosis was produced by day-and-night illumination of the animals having been continued for 30 days. Melatonin was administered applied *per os* daily at the total dose of 30 mg/kg. A solution of melatonin in isotonic NaCl solution was prepared from the Melaxen drug (INN: melatonin, “Unipharm Inc.,” USA) *ex tempore*. To study innate immunity of blood cells, we determined leukocyte numbers, WBC differential counts, and functional activity of phagocytes, as spontaneous and induced NBT test, as well as engulfment of polystyrene latex particles. Th1-specific immune response was studied according to degree of delayed type hypersensitivity reaction; Th2-dependent response was assessed as the numbers of antibody-forming cells in the spleen of the animals after immunization with allogeneic erythrocytes. Serum concentrations of interleukin 4 (IL-4), interferon-gamma (IFN γ), melatonin, and cortisol were measured by enzyme immunoassay, using the “Immulayt 2000” (USA) with guinea pig-specific test systems. It was found that experimental desynchronosis was associated with leukocytosis, lympho- and monocytopenia, activation of oxygen-dependent metabolism of blood phagocytes, suppression of Th1- and Th2-dependent immune response. Desynchronosis was also accompanied by decreased concentrations of serum melatonin, IFN γ and IL-4, along with increased cortisol concentrations. Reduced IFN γ and IL-4 amounts was associated with decreased melatonin concentrations. Suppression of Th1- and Th2-dependent immune response is found to develop in accordance with reduction in IFN γ and IL-4. Melatonin administration in desynchronosis (a total of 30 mg/kg) resulted in recovery of blood leukocyte counts, ROS generation by phagocytes, higher intensity of Th1- and Th2-dependent immune response, cortisol, IFN γ and IL-4 concentrations in blood serum, like as stimulation of blood phagocytic capacity. Restoration of Th1- and Th2-dependent immune response is associated with normalized concentrations of, respectively, IFN γ and IL-4 levels in blood serum.

Keywords: melatonin, desynchronosis, innate and adaptive immunity, cytokines

Введение

Неуклонный прогресс в жизни общества привел к использованию высокотехнологичных светодиодных энергосберегающих технологий и вытеснил из применения традиционные источники освещения. Использование искусственного освещения в ночное время удлиняет световой период и может приводить к возникновению десинхроноза, который является ключевым звеном в патогенезе многих заболеваний, приводит к преждевременному старению организма [1]. Развитие десинхроноза связывают с изменением синтеза мелатонина (МТ), специфические мембранные рецепторы к которому с разной аффинностью МТ-1 и МТ-2 представлены на клетках гипофиза, супрахиазматического ядра гипоталамуса, сетчатки глаза, а также на иммунокомпетентных клетках, в том числе на тимоцитах, спленоцитах, моноцитах, натуральных киллерах,

ядерные рецепторы к мелатонину были обнаружены на Т-лимфоцитах [8, 9, 17, 24]. Показано, что изменение цикличности синтеза и секреции мелатонина нарушает процессы пролиферации, дифференцировки, миграции, кооперации иммунокомпетентных клеток [10]. Понимание механизма действия мелатонина создает предпосылки для фармакологической коррекции и профилактики нарушений иммунитета при десинхронозе [15]. Ранее нами продемонстрировано стимулирующее влияние экзогенного мелатонина на функциональную активность нейтрофильных гранулоцитов периферической крови у лабораторных животных при десинхронозе [3, 4].

Цель работы – исследовать механизм влияния экзогенного мелатонина на показатели врожденного и адаптивного иммунитета при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного искусственного освещения.

Материалы и методы

Исследование выполнено на 196 нелинейных половозрелых морских свинок массой 300 ± 50 г, которых содержали в стандартных условиях вивария, в соответствии с правилами гуманного отношения к животным, методическими рекомендациями по их выведению из опыта и эвтаназии. Морская свинка в отличие от других экспериментальных животных (крысы, мыши) по образу жизни и световосприятию является наиболее адекватным объектом для изучения свет-ассоциированных измененных состояний гомеостаза. Животные случайным образом были распределены на 3 группы. Группа 1 ($n = 66$) – животные, находящиеся в условиях стандартного фиксированного (12 ч свет/12 ч темнота) освещения (СФО), генерируемого светодиодными носителями («Открытые инженерные системы», Россия), цветовая температура 4500 К (белый свет), мощность светового потока $0,03 \text{ Вт/м}^2$ при длине волны 360 нм, коэффициент пульсации светового потока 1%, освещенность 400 лк. Группа 2 ($n = 64$) – десинхроноз в условиях светодиодного освещения. Группа 3 ($n = 66$) – животные, которым на фоне десинхроноза вводили экзогенный мелатонин. Световой десинхроноз создавали искусственно путем содержания лабораторных животных при круглосуточном освещении [5]. Введение мелатонина животным осуществляли *per os* в дозе 1 мг/кг ежедневно в 21 ч с 1 суток от начала эксперимента в течение 30 дней, суммарная доза составила 30 мг/кг. Раствор мелатонина в изотоническом растворе NaCl готовили из препарата «Мелаксен» (МНН: мелатонин, «Юнифарм Инк.», США) *ex tempore*. Животным 2 группы вводили эквивалентное количество изотонического раствора NaCl. Кровь у животных забирали путем пункции левого желудочка сердца на 10 суток, 20 суток, 30 суток эксперимента. Для исследования врожденного иммунитета в крови общепринятыми методами определяли количество лейкоцитов, лейкоцитарную формулу и функциональную активность фагоцитов по показателям спонтанного и индуцированного НСТ-теста и поглощению частиц монодисперсного полистирольного латекса [7]. Th1-зависимый иммунный ответ исследовали по интенсивности реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), Th2-зависимый иммунный ответ оценивали по количеству антителообразующих клеток (АОК) в селезенке после иммунизации аллогенными эритроцитами. Методом иммуноферментного анализа на аппарате «Иммулайт 2000» (США) определяли в сыворотке концентрацию интерлейкина-4 (IL-4), интерферона-гамма (IFN γ) с помощью специ-

фичных для морских свинок тест-систем «USCN Life Science Inc.» (Китай), концентрацию мелатонина, кортизола – с помощью тест-систем «Cusabio» (Китай). Статистический анализ проведен с использованием пакета прикладных программ Statistica for Windows 10.0. Для оценки значимости различий между группами использованы непараметрические критерии Манна–Уитни, Краскела–Уоллиса, корреляционный анализ проводили с применением коэффициента корреляции Спирмена (R).

Результаты

Установлено, что при экспериментальном десинхронозе в периферической крови лабораторных животных на 10 и 20 сутки повышается общее количество лейкоцитов, на 10, 20 и 30 сутки повышается количество сегментоядерных нейтрофилов и, как следствие, общее количество нейтрофилов, снижается количество моноцитов, на 30 сутки снижается количество лимфоцитов (табл. 1). При оценке функциональной активности фагоцитов периферической крови на 20 и 30 сутки обнаружено повышение генерации АФК фагоцитами по показателям спонтанного и индуцированного НСТ-теста. При исследовании адаптивного иммунитета на 20 и 30 сутки эксперимента отмечено снижение интенсивности реакции ГЗТ и уменьшение абсолютного и относительного количества АОК в селезенке лабораторных животных, что свидетельствует об угнетении Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа (табл. 2). На 10, 20 и 30 сутки при десинхронозе в плазме снижается концентрация мелатонина, повышается концентрация кортизола (табл. 3). При оценке цитокинового профиля в крови выявлено на 20 и 30 сутки снижение концентрации IL-4, на 30 суток – снижение концентрации IFN γ .

Введение экзогенного мелатонина при экспериментальном десинхронозе приводит к восстановлению количественного состава лейкоцитов в периферической крови: на 20 и 30 суток уменьшается количество сегментоядерных нейтрофилов и, как следствие, общее количество нейтрофилов, на 20 и 30 суток повышается количество моноцитов, на 30 суток повышается количество лимфоцитов (табл. 1). При введении мелатонина на 30 суток наблюдения активизируется поглотительная способность фагоцитов в периферической крови по показателям активности и интенсивности фагоцитоза, снижается генерация АФК фагоцитами по показателям активности и интенсивности индуцированного НСТ-теста. В условиях применения экзогенного мелатонина на 20 и 30 суток восстанавливаются Th1- и Th2-зависимый иммунный ответ на основании повы-

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ (M±m)

Группы / Показатели	10 сутки эксперимента			20 сутки эксперимента			30 сутки эксперимента		
	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 8)	Группа 3 (n = 8)	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 6)	Группа 3 (n = 8)	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 8)	Группа 3 (n = 8)
Лейкоциты, × 10 ⁹ /л	8,90±0,46	11,00±0,52*	10,62±0,43	9,03±0,17	10,46±0,26*	10,20±0,55	10,23±0,10	9,94±0,15	10,55±0,27
Нейтрофилы п/ядерные, × 10 ⁹ /л	0,48±0,14	0,66±0,14	0,42±0,15	0,59±0,12	0,48±0,02	0,69±0,10	0,59±0,09	0,47±0,13	0,42±0,04
Нейтрофилы с/ядерные, × 10 ⁹ /л	3,43±0,62	5,92±0,45*	5,85±0,47	4,13±0,81	6,35±0,23*	4,38±0,30#	4,99±0,12	5,82±0,36*	4,25±0,23#
Нейтрофилы, всего, × 10 ⁹ /л	3,91±0,72	6,59±0,31*	6,27±0,43	4,72±0,19	6,83±0,22*	5,07±0,31#	5,58±0,10	6,30±0,25*	4,59±0,26#
Лимфоциты, × 10 ⁹ /л	4,06±1,03	3,96±0,44	3,82±0,78	3,78±0,06	3,20±0,28	3,88±0,56	4,09±0,16	3,43±0,24*	4,63±0,25#
Моноциты, × 10 ⁹ /л	0,90±0,08	0,40±0,02*	0,52±0,10	0,52±0,03	0,43±0,11*	1,21±0,21#	0,55±0,07	0,43±0,07*	1,23±0,08#
Активность фагоцитоза, %	28,67±1,64	30,67±0,76	29,67±0,76	32,67±2,31	30,33±0,56	31,67±2,78	27,33±1,52	26,75±1,47	35,33±1,72#
Интенсивность фагоцитоза, у.е.	1,03±0,06	1,05±0,04	1,06±0,05	1,00±0,06	1,02±0,04	1,15±0,05	1,05±0,05	0,99±0,05	1,27±0,07#
СНСТ-тест, активность, %	41,33±1,28	42,33±1,91	43,00±1,93	42,00±2,03	43,67±3,94	39,33±1,28	41,67±1,38	44,25±1,70	37,00±4,12#
СНСТ-тест., интенсивность, у.е.	1,53±0,02	1,49±0,07	1,43±0,08	1,52±0,19	1,70±0,07*	1,62±0,13	1,69±0,05	1,76±0,03	1,61±0,12
ИНСТ-тест, активность, %	77,00±2,98	78,00±2,28	83,33±5,18	75,33±4,26	84,33±4,10	81,33±5,29	74,67±2,20	86,00±1,87*	73,33±4,77#
НСТ-инд. интенсивность, у.е.	1,66±0,09	1,52±0,10	1,67±0,06	1,62±0,16	1,64±0,09	1,66±0,22	1,61±0,02	1,89±0,06*	1,60±0,10#

Примечание. * – статистически (p ≤ 0,05) значимые различия между показателями в группах 1 и 2, # – статистически (p ≤ 0,05) значимые различия между показателями в группах 2 и 3. СНСТ-тест – спонтанный НСТ-тест, ИНСТ – индуцированный НСТ-тест.

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ МЕЛАТОНИНА НА ПОКАЗАТЕЛИ АДАПТИВНОГО ИММУНИТЕТА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ (M±m)

Группы / Показатели	10 сутки эксперимента			20 сутки эксперимента			30 сутки эксперимента		
	Группа 1 (n = 14)	Группа 2 (n = 14)	Группа 3 (n = 14)	Группа 1 (n = 14)	Группа 2 (n = 14)	Группа 3 (n = 14)	Группа 1 (n = 14)	Группа 2 (n = 14)	Группа 3 (n = 14)
Интенсивность ГЗТ, мл	0,44±0,02	0,39 ±0,01	0,41±0,02	0,41±0,02	0,30±0,03*	0,44±0,03 #	0,42±0,03	0,34±0,03*	0,49±0,02#
АОК в селезенке × 10 ⁶ ед.	33,48±2,20	30,71±5,93	30,97±3,76	31,16±2,83	25,79±1,36*	33,39±2,03 #	31,29±2,42	22,61±2,02*	34,58±3,30*
АОК в селезенке × 10 ⁶ ЯСК	346,64±57,54	360,01±67,67	337,61±53,03	323,04±23,13	281,98±38,19*	340,40±18,92 #	319,06±50,61	244,21±52,94*	433,98±72,91#

Примечание. См. примечание к таблице 1.

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ ГОРМОНОВ И ИНТЕРЛЕЙКИНОВ В ПЛАЗМЕ У ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ДЕСИНХРОНОЗЕ (M±m)

Группы / Показатели	10 сутки эксперимента			20 сутки эксперимента			30 сутки эксперимента		
	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 8)	Группа 3 (n = 8)	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 6)	Группа 3 (n = 8)	Группа 1 (n = 8)	Группа 2 (n = 8)	Группа 3 (n = 8)
Мелатонин нг/мл	5,10±0,10	4,31±0,11*	5,16±0,08#	4,45±0,17	3,75±0,24*	5,93±0,13#	4,71±0,12	3,12±0,11*	6,52±0,20#
Кортизол нг/мл	178,89±2,43	186,35±1,87*	160,56±19,81#	181,81±2,62	187,60±2,59*	152,64±18,59#	185,17±0,16	188,58±2,42*	143,75±6,59#
IFN γ , пг/мл	10,46±2,31	8,77±1,82	6,78±0,99	8,30±3,75	7,32±0,77	8,65±0,59	6,38±1,70	3,47±0,48*	9,78±1,63#
IL-4, пг/мл	23,20±5,98	20,58±4,60	14,77±4,66	21,63±3,52	15,77±2,02*	29,51±4,71#	16,57±3,72	12,22±4,0*	31,70±4,93#

Примечание. См. примечание к таблице 1.

шения интенсивности реакции ГЗТ и количества АОК в селезенке в абсолютных и относительных величинах (табл. 2). В плазме крови повышается концентрация мелатонина на 10, 20 и 30 сутки эксперимента, снижается концентрация кортизола на 10, 20 и 30 сутки (табл. 3). В условиях применения мелатонина при десинхронозе повышается концентрация IL-4 на 20 и 30 сутки и концентрация IFN γ на 30 сутки наблюдения.

Обсуждение

Разнонаправленные изменения количественного состава лейкоцитов в крови при десинхронозе могут быть связаны, во-первых, с угнетением пролиферации и дифференцировки клеток лимфоидного ряда в тимусе и в селезенке [6]. Во-вторых, нейтрофильный лейкоцитоз при десинхронозе может рассматриваться как проявление стресс-реакции; известно, что кортизол обладает демаргинирующим действием на пристеночный пул нейтрофилов [11]. В литературе представлены сведения как о снижении, так и о повышении поглотительной активности нейтрофилов, генерации ими активных форм кислорода, хемотаксиса при десинхронозе, что связывают с подавлением выработки мелатонина [2, 13]. Накоплены данные о циркадном контроле функциональной активности фагоцитов, изменение которого провоцирует развитие заболеваний воспалительного генеза в связи с дисфункцией фагоцитов [14, 21].

Изменения иммунного статуса при десинхронозе могут быть обусловлены не только дефицитом эндогенного мелатонина в условиях функциональной пинеалэктомии, но и изменением нейро-эндокринно-иммунных взаимодействий, например, с участием оси эпифиз–гипоталамус–надпочечники–эффекты адреналина, кортизола [20]. Кроме того, при нарушении циркадного ритма изменяется активность эндотелиоцитов, эпителиальных и др. клеток, синтезирующих цитокины. Нами обнаружена обратная слабая связь между концентрацией мелатонина и концентрацией IFN γ в плазме ($R = 0,42$; $p < 0,05$). Зафиксированная при экспериментальном десинхронозе депрессия адаптивного иммунитета ассоциирована с изменением концентрации IL-4 и IFN γ . При проведении корреляционного анализа на 30 сутки десинхроноза установлена прямая сильная связь между интенсивностью реакции ГЗТ и концентрацией IFN γ ($R = 0,93$; $p < 0,05$), прямая сильная связь между количеством АОК в селезенке и концентрацией IL-4 ($R = 0,97$; $p < 0,05$). Кроме того, в развитии депрессии адаптивного иммунитета при десинхронозе может иметь значение лимфоцитопения.

Патогенетически обоснованным подходом для коррекции изменений иммунного статуса при десинхронозе выступает применение мелатонина. Иммуотропные эффекты мелатонина могут быть обусловлены его прямым рецептор-опосредованным действием на иммунокомпетентные клетки, а также влиянием на них гормонов, цитокинов, нейрогенными эффектами, концентрация/активность которых модулируется в условиях применения мелатонина. В литературе имеются противоречивые данные о влиянии мелатонина на поглотительную способность, окислительные процессы в фагоцитах в зависимости от применяемой дозы и способа введения мелатонина, исходного функционального состояния клетки и метода регистрации [18, 19, 22]. Считается, что мелатонин, действуя через мембранные рецепторы на нейронах передней доли гипофиза, снижает выброс АКТГ, концентрацию кортизола и катехоламинов, способствуя тем самым восстановлению количественного состава и функциональной активности лейкоцитов [23].

Эффекты мелатонина на показатели иммунитета, в том числе, обусловлены его влиянием на синтез и секрецию иммунными клетками IL-4 и IFN γ . Рядом исследователей показано, что мелатонин в условиях *in vitro* стимулирует секрецию IL-2, IL-4, IFN γ человеческими моноцитами, лимфоцитами и спленоцитами через ядерный рецептор-опосредованный механизм [12, 16]. С использованием корреляционного анализа установлено наличие прямой сильной связи между концентрацией мелатонина в сыворотке и концентрацией IFN γ на 30 сутки ($R = 0,54$; $p < 0,05$), концентрацией IL-4 на 20 сутки ($R = 0,65$; $p < 0,05$) и 30 сутки ($R = 0,43$; $p < 0,05$). Кроме того, в условиях применения мелатонина при десинхронозе на 30 сутки прослеживается корреляция между интенсивностью реакции ГЗТ и концентрацией IFN γ ($R = 0,56$; $p < 0,05$), количеством АОК в селезенке и концентрацией IL-4 ($R = 0,49$; $p < 0,05$).

Таким образом, при экспериментальном десинхронозе наблюдается нейтрофильный лейкоцитоз, лимфоцитопения и моноцитопения, активация кислород-зависимого метаболизма фагоцитов в периферической крови, подавление Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа. Десинхроноз сопровождается снижением концентрации в сыворотке мелатонина, IFN γ и IL-4, повышением концентрации кортизола. Снижение концентрации IFN γ и IL-4 ассоциировано со снижением концентрации мелатонина, а угнетение Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа прогрессирует по мере снижения уровня IFN γ

и IL-4 соответственно. Применение при десинхронозе мелатонина в суммарной дозе 30 мг/кг приводит к восстановлению количественного состава лейкоцитов в периферической крови, генерации АФК фагоцитами, выраженности Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа, кон-

центрации кортизола, IFN γ и IL-4 в сыворотке, а также стимулирует поглотительную способность фагоцитов в крови. Восстановление Th1- и Th2-зависимого иммунного ответа ассоциировано с нормализацией концентрации IFN γ и IL-4 в сыворотке соответственно.

Список литературы / References

1. Анисимов В.Н. Мелатонин: роль в организме, применение в клинике. СПб.: Система, 2007. 40 с. [Anisimov V.N. Melatonin: role in the body, applying in the clinic]. St. Petersburg: Sistema, 2007. 40 p.
2. Бородин Ю.И., Труфакин В.А., Мичурина С.В., Шурлыгина А.В. Структурно-временная организация печени, лимфатической, иммунной, эндокринной систем при нарушении светового режима и введении мелатонина. Новосибирск: Манускрипт, 2012. 207 с. [Borodin Yu.I., Trufakin V.A., Michurina S.V., Shurlygina A.V. Structure-temporal organization of the liver, lymphatic, immune and endocrine systems in violation of the light regime and the introduction of melatonin]. Novosibirsk: Manuscript, 2012. 207 p.
3. Осиков М.В., Гизингер О.А., Огнева О.И. Иммуотропные эффекты мелатонина при экспериментальном десинхронозе в условиях светодиодного искусственного освещения // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 2 (1). С. 119-122. [Osikov M.V., Gizinger O.A., Ogneva O.I. Immunotropic effects of melatonin in experimental desynchronoses under artificial lighting LED. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 2 (1), pp. 119-122. (In Russ.)]
4. Осиков М.В., Огнева О.И., Листик Е.В. Иммуотропные эффекты мелатонина при экспериментальном десинхронозе в условиях люминесцентного освещения // Здоровье и образование в XXI веке, 2014. Т. 16, № 4. С. 66-67. [Osikov M.V., Ogneva O.I., Listik E.V. Immunotropic effects of melatonin in experimental desynchronoses under fluorescent lighting conditions. *Zdorov'e i obrazovanie v XXI veke = Health and Education in Millennium*, 2014, Vol. 16, no. 4, pp. 66-67. (In Russ.)]
5. Труфакин В.А., Шурлыгина А.В., Мичурина С.В. Лимфоидная система – циркадианная временная организация и десинхроноз // Бюллетень сибирского отделения российской академии медицинских наук, 2012. Т. 32, № 1. С. 5-12. [Trufakin V.A., Shurlygina A.V., Michurina S.V. Lymphoid system – circadian temporary organization and desynchronosis. *Byulleten' sibirskogo otdeleniya rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, Vol. 32, no. 1, pp. 5-12. (In Russ.)]
6. Шурлыгина А.В., Мельникова Е.В., Пантелеева Н.Г., Тендитник М.В., Душкин М.И., Храпова М.В., Труфакин В.А. Влияние экспериментального десинхроноза на органы иммунной системы у крыс WAG и ISIAH // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 155, № 5. С. 611-614. [Shurlygina A.V., Melnikova E.V., Panteleeva N.G., Tenditnik M.V., Dushkin M.I., Khrapova M.V., Trufakin V.A. Effects of experimental desynchronoses on the organs of immune system in WAG and ISIAH rats // *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 155, no. 5, pp. 611-614. (In Russ.)]
7. Фрейдлин И.С. Методы изучения фагоцитирующих клеток при оценке иммунного статуса человека: учебное пособие. Л., 1986. 37 с. [Freidlin I.S. Methods of study of phagocytic cells in assessing the immune status of the person: a tutorial]. Leningrad, 1986. 37 p.
8. Cernysiov V., Bozait R., Mauricas M., Girkontaite I. Influence of circadian time and lighting conditions on expression of melatonin receptors 1 and 2 in murine lymphocytes. *In Vivo*, 2014, Vol. 28, no. 5, pp. 831-835.
9. Cernysiov V., Bozait R., Mauricas M., Girkontaite I. The expression of MTNR3 and nuclear receptors in murine leucocytes. *In Vivo*, 2014, Vol. 24, no. 5, pp. 827-830.
10. Claustrat A., Brunand J., Chazot G. The basic physiology and pathophysiology of melatonin. *Sleep Medicine Reviews*, 2005, Vol. 9, pp. 11-24.
11. Dhabhar F.S., Miller A.H., McEwen B.S., Spencer R.L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution Role of adrenal steroidhormones. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 4, pp. 1638-1644.
12. García-Mauriño S., Pozo D., Calvo J.R. Correlation between nuclear melatonin receptor expression and enhanced cytokine production in human lymphocytic and monocytic cell lines. *J. Pineal. Res.*, 2000, Vol. 29, no. 3, pp. 129-137.
13. Hriscu M.L. Modulatory factors of circadian phagocytic activity. *Ann NY Acad. Sci.*, 2005, Vol. 1057, pp. 403-430.
14. Keller M., Mazuch J., Abraham U., Eom G.D., Herzog E.D., Volk H.D., Kramer A., Maier B.A. Circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 50, pp. 21407-21412.
15. Kovacic P., Somanathan R. Cell signaling, receptors, electrical effects and therapy incircadian rhythm. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 2013, Vol. 33, no. 5, pp. 267-275.
16. Maestroni G.J. T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin. *J. Pineal. Res.*, 1995, Vol. 18, no. 2, pp. 84-89.

17. Pandi-Perumal S.R., Srinivasan V., Maestroni G.J., Cardinali D.P., Poeggeler B., Hardeland R. Melatonin: Nature's most versatile biological signal? *FEBS Journal*, 2006, Vol. 273, pp. 2813-2838.
18. Pieri C., Recchioni R., Moroni F., Marcheselli F., Marra M., Marinoni S., Di Primio R. Melatonin regulates the respiratory burst of human neutrophils and their depolarization. *J. Pineal Res.*, 1998, Vol. 24, pp. 43-49.
19. Rodriguez A.B., Ortega E., Lea R.W., Barriga C. Melatonin and the phagocytic process of heterophils from the ring dove (*Streptopelia risoria*). *Mol. Cell. Biochem.*, 1997, Vol. 168, no. 1-2, pp. 185-190.
20. Scheiermann C., Kunisaki Y., Lucas D., Chow A., Jang J.E., Zhang D., Hashimoto D., Merad M., Frenette P.S. Adrenergic nerves govern circadian leukocyte recruitment to tissues. *Immunity*, 2012, Vol. 37, no. 2, pp. 290-301.
21. Silver A.C., Arjona A., Walker W.E., Fikrig E. The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 2, pp. 251-261.
22. Terron M.P., Paredes S.D., Barriga C., Ortega E., Reiter R.J., Rodriguez A.B. Oral administration of melatonin to old ring doves (*Streptopelia risoria*) increases plasma levels of melatonin and heterophil phagocytic activity. *J. Gerontol. A Biol. Sci.*, 2005, Vol. 60, no. 1, pp. 44-50.
23. Tsukamoto N., Otsuka F., Ogura-Ochi K., Inagaki K., Nakamura E., Toma K., Terasaka T., Iwasaki Y., Makino H. Melatonin receptor activation suppresses adrenocorticotropin production via BMP-4 action by pituitary AtT20 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2013, Vol. 375, no. 1-2, pp. 1-9.
24. Zlotos D.P., Jockers R., Cecon E., Rivara S., Witt-Enderby P.A. MT1 and MT2 melatonin receptors: ligands, models, oligomers, and therapeutic potential. *J. Med. Chem.*, 2014, Vol. 57, no. 8, pp. 3161-3185.

Авторы:

Осиков М.В. — д.м.н., профессор, кафедра патологической физиологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Гизингер О.А. — д.б.н., доцент, профессор, кафедра микробиологии, вирусологии иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Огнева О.И. — аспирант, научно-образовательный центр «Проблемы фундаментальной медицины» ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Osikov M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pathological Physiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Gizinger O.A., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Diagnostics, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Ogneva O.I., Postgraduate Student, Research Center for Basic Medicine, of REC "Problems of Basic Medicine", South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 17.06.2015
Отправлена на доработку 30.06.2015
Принята к печати 21.09.2015

Received 17.06.2015
Revision received 30.06.2015
Accepted 21.09.2015

ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ МЕТОДОМ МНОГОЦВЕТНОЙ ПРОТОЧНОЙ ЦИТОМЕТРИИ

Кудрявцев И.В.^{1,2,3}, Борисов А.Г.^{4,5}, Кроби́нец И.И.⁶, Савченко А.А.^{4,5},
Серебрякова М.К.¹

¹ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

³ ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

⁵ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Минздрава России, г. Красноярск, Россия

⁶ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России»,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. С использованием многоцветной проточной цитометрии на основании экспрессии CD27, CD28, CD45RA и CD62L цитотоксические Т-лимфоциты периферической крови можно разделить на несколько субпопуляций. В рамках данного исследования проведено сравнение двух основных подходов, направленных на выявление популяций CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов, находящихся на разных стадия дифференцировки. Объектом исследования служила венозная кровь 59 мужчин и 51 женщины в возрасте 18-65 лет. Первый подход основан на первоначальной оценке уровня CD45RA и CD62L, позволяющий выявить «наивные» клетки (CD45RA⁺CD62L⁺, в среднем 30% от всех CD3⁺CD8⁺), клетки центральной (CD45RA⁻CD62L⁺, ~11%) и эффекторной (EM, CD45RA⁻CD62L⁻, ~35%) памяти, а также терминально-дифференцированные эффекторные клетки (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻, ~24%). На основании экспрессии CD27 и CD28 EM разделяют на отдельные субпопуляции, к числу которых относятся EM1 (CD27⁺CD28⁺, ~19% от CD3⁺CD8⁺), EM2 (CD27⁺CD28⁻, ~5%), EM3 (CD27⁻CD28⁻, ~9%) и EM4 EM2 (CD27⁻CD28⁺, ~2%). В свою очередь TEMRA подразделяются на pE1 (CD27⁺CD28⁺, ~3% от CD3⁺CD8⁺), pE2 (CD27⁺CD28⁻, ~5%) и эффекторные клетки (E, CD27⁻CD28⁻, ~15%). Второй подход основан на первоначальном определении уровня экспрессии CD27 и CD28 с последующим анализом CD45RA и CD62L на популяции с фенотипом CD27⁺CD28⁺. В этом случае выявляют «наивные» цитотоксический Т-клетки фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺ (~30% от CD3⁺CD8⁺), клетки центральной памяти – CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺ (~12%), переходные или «транзиторные» клетки памяти – CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻ (~12%), а также клетки эффекторной памяти и эффекторные клетки (CD27⁺CD28⁻, ~11% и CD27⁻CD28⁻, ~24% соответственно), оценка CD45RA и CD62L на которых не производится. Сформированы нормативные значения для указанной возрастной группы в относительных и абсолютных величинах. В рамках использования подхода, осно-

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.
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:

И.В. Кудрявцев, А.Г. Борисов, И.И. Кроби́нец,
А.А. Савченко, М.К. Серебрякова, «Определение основных
субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов методом
многоцветной проточной цитометрии» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 525-538.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538

For citation:

I.V. Kudryavtsev, A.G. Borisov, I.I. Krobínets, A.A. Savchenko,
M.K. Serebryakova, "Multicolor flow cytometric analysis
of cytotoxic T cell subsets", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 525-538.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-525-538

© Кудрявцев И.В. и соавт., 2015

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-525-538>

ванного на первоначальной экспрессии CD45RA и CD62L, обнаружена значительная обратная зависимость между возрастом и уровнем «наивных» CD3⁺CD8⁺ клеток (для относительных значений $r = -0,646$ при $p < 0,001$, для абсолютных – $r = -0,562$ при $p < 0,001$). С возрастом увеличивалось содержание клеток субпопуляций EM3 ($r = 0,474$ при $p < 0,001$ и $r = 0,435$ при $p < 0,001$ соответственно) и E ($r = 0,393$ при $p < 0,001$ и $r = 0,375$ при $p < 0,001$ соответственно). В рамках применения подхода, основанного на первоначальной оценке экспрессии CD27 и CD28, обнаружена аналогичная зависимость для «наивных» клеток ($r = -0,638$ при $p < 0,001$ и $r = -0,530$ при $p < 0,001$ соответственно). По мере увеличения возраста наблюдалось возрастание в периферической крови клеток с фенотипом CD27⁺CD28⁻ ($r = 0,495$ при $p < 0,001$ и $r = 0,442$ при $p < 0,001$ соответственно).

Ключевые слова: проточная цитометрия, многоцветный анализ, субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, CD45RA и CD62L, CD27 и CD28

MULTICOLOR FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS OF CYTOTOXIC T CELL SUBSETS

Kudryavtsev I.V.^{a, b, c}, Borisov A.G.^{d, e}, Krobinets I.I.^f, Savchenko A.A.^{d, e}, Serebryakova M.K.^b

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

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^c N.N. Petrov Research Institute of Oncology, St. Petersburg, Russian Federation

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

^e Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^f Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Multiparametric flow analysis has offered an ability of simultaneous analysis of multiple molecules at the single-cell level. Peripheral blood cells from 110 healthy subjects aged 18–65 years (59 males and 51 females) were stained with antibodies to CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45, CD45RA and CD62L, and analyzed using different gating strategies. The first one was based on initial analysis of CD45RA and CD62L expression, and CD3⁺CD8⁺ cells were divided into naïve population (CD45RA⁺CD62L⁺) comprising approx. 30% of the CD3⁺CD8⁺ subset; central memory cells (CD45RA⁻CD62L⁺, ~11%), effector memory cells (EM; CD45RA⁻CD62L⁻, ~35%) and «terminally differentiated» effector memory cells (TEMRA, CD45RA⁺CD62L⁻, ~24% of total CD8⁺ subset). As based on expression of CD27 and CD28 in EM and TEMRA, some further populations were distinguished, i.e., CD27⁺CD28⁺ (termed as EM1, about 19% from CD3⁺CD8⁺); CD27⁺CD28⁻ (EM2, ~5%), CD27⁻CD28⁻ (EM3, ~9%) and CD27⁻CD28⁺ (EM4, ~2%). Appropriate subsets were identified within TEMRA population, as follows: CD27⁺CD28⁺ (pE1, ~3%), CD27⁺CD28⁻ (pE2, ~5%) and CD27⁻CD28⁻ (E, ~15%). The second approach was based on initial expression of CD27 and CD28, followed by analysis of CD45RA and CD62L expression on CD27⁺CD28⁺ subset. Total cytotoxic T cell population was divided into naïve – CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺ (~30% from CD3⁺CD8⁺ subset), central memory (CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺, ca.~12% of total), transitional memory cells (CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻, approx.~12%), as well as effector memory cells and effector cells (CD27⁺CD28⁻, ~11% и CD27⁻CD28⁻, ~24%, respectively). Expression of CD45RA and CD62L was not analyzed for the latter two populations. Frequencies of all cell populations, identified by means of two different gating strategies, were expressed as percentages of the total CD3⁺CD8⁺ and absolute cell counts. Using the gating strategy based on initial analysis of CD45RA and CD62L, some correlations between naïve CD3⁺CD8⁺ frequencies and donor age were revealed ($r = -0.646$, $p < 0.001$, and $r = -0.562$, $p < 0.001$, respectively). Relative and absolute counts of EM3 ($r = 0.474$, $p < 0.001$ and $r = 0.435$, $p < 0.001$, respectively) and E subsets ($r = 0.393$, $p < 0.001$ and $r = 0.375$, $p < 0.001$, respectively) CD3⁺CD8⁺ subsets showed linear increase with age. Usage of another gating strategy based on CD27 and CD28 expression revealed age-dependent changes in relative and absolute frequencies of naïve CD3⁺CD8⁺ ($r = -0.638$, $p < 0.001$ and $r = -0.530$, $p < 0.001$, respectively). Meanwhile, CD27⁻CD28⁻ subset accumulated linearly with age ($r = 0.495$, $p < 0.001$ and $r = 0.442$, $p < 0.001$, respectively). The results suggest that differences in subset distribution are responsible for age-related changes in CD8⁺ cells.

Keywords: flow cytometry, multicolor analysis, cytotoxic T cell subsets, CD45RA/CD62L coexpression, CD27/CD28 phenotype

Введение

Цитотоксические Т-лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD8⁺ играют ведущую роль в специфической защите организма от внутриклеточных патогенов или собственных измененных клеток [14]. Способность проявлять эффекторные свойства, к числу которых относятся синтез специфических цитокинов, секреторная дегрануляция и высвобождение перфорина и гранзимов, определяется уровнем зрелости или стадией дифференцировки клетки. Образование «наивных» цитотоксических Т-клеток происходит в тимусе, где эти клетки последовательно проходят несколько стадий селекции, успешное завершение которых сопровождается формированием Т-клеточного рецептора определенной специфичности и выходом клеток в циркуляцию. Обычно «наивные» CD3⁺CD8⁺ лимфоциты экспрессируют несколько основных поверхностных антигенов — различные изоформы CD45, CD62L и/или CCR7 (CD197), CD27 и CD28, которые позволяют отличить их от более зрелых форм клеток, циркулирующих в периферической крови. Именно на оценке уровней экспрессии этих молекул основаны современные подходы к определению стадий дифференцировки или степени зрелости цитотоксических Т-лимфоцитов, применяемые как в научных, так и клинических иммунологических исследованиях [6, 13].

Из всех указанных выше поверхностных антигенов CD45 имеет самую длительную историю применения. Еще в 1988 году было показано, что CD45R (в настоящее время — CD45RA) может рассматриваться в качестве маркера «наивных» или «не праймированных» Т-клеток, тогда как антитело UCHL1, распознающее CD45R0, выявляет Т-клетки иммунологической памяти [15]. «Наивные» Т-клетки в составе белковой формы молекулы CD45 несут все домены (обозначаемые как А, В и С), но по мере созревания Т-лимфоцитов — уже в ходе антиген-зависимой дифференцировки — происходит сплайсинг участков РНК, кодируемых экзонами А, затем В и С [14]. Продукт, содержащий все названные домены, обозначают как CD45RA (молекулярная масса 220 кДа), а продукт конечной модификации РНК, лишенный всех названных доменов, называют CD45R0 (180 кДа). Функциональная значимость различных изоформ CD45 до настоящего времени остается малоисследованной, чего нельзя сказать об остальных поверхност-

ных антигенах, применяемых для типирования ключевых стадий созревания Т-клеток. Так, впервые о CD62L (L-селектин) как о молекуле, определяющей направление миграции «наивных» Т-лимфоцитов в периферические лимфоидные органы, упоминали Picker и соавторы [31]. В рамках данного исследования было отмечено, что «наивные» Т-лимфоциты (CD45RA^{high}/CD45R0^{low}) преимущественно экспрессируют CD62L, тогда как среди более зрелых клеток — CD45RA^{low}/CD45R0^{high} — можно было выделить как популяцию CD62L⁺, так и CD62L⁻. Причем на поверхности CD62L-негативных Т-клеток были обнаружены адгезионные молекулы, ответственные за миграцию в периферические ткани. В настоящее время считается, что пара CD62L и CCR7 определяет процессы миграции CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клеток периферической крови. Например, основными лигандами CD197 (CCR7) являются β-хемокины — CCL19, синтезируемый посткапиллярными венулами с высоким эндотелием, и CCL21, секретируемый стромальными и дендритными клетками Т-зависимых зон периферических лимфоидных органов. Столь же существенную роль в миграции Т-клеток в лимфатические узлы и Пейеровы бляшки играет CD62L, лигандами которого на поверхности эндотелия выступают GlyCAM, PSGL-1 и CD34. Наличие на клеточной мембране CCR7 и CD62L позволяет выделить популяции «наивных» Т-клеток и Т-клеток центральной памяти среди общего пула циркулирующих Т-лимфоцитов [35]. Отсутствие этих поверхностных антигенов на популяциях эффекторных клеток — эффекторные клетки памяти и терминально-дифференцированные эффекторы — обусловлено тем, что функции этих клеток реализуются вне лимфоидной ткани.

Одной из важнейших функций молекулы CD27, принадлежащей к семейству TNFR, является защита активированных «наивных» Т-клеток и Т-клеток памяти от апоптоза за счет усиления экспрессии анти-апоптотических белков в ядре клетки посредством сигнальных каскадов, связанных с активацией NF-κB и JNK. Поэтому данный антиген традиционно рассматривается в качестве маркера «не эффекторных» клеток, которым для активации и формирования клона антиген-специфических клеток необходим CD70 [16]. В свою очередь, CD28 относится к иммуноглобулиновому суперсемейству и является трансмембранным гомодимерным гликопротеи-

ном с молекулярной массой каждой цепи около 44 кДа, в составе цитоплазматического домена которых обнаружены четыре остатка тирозина, необходимые для фосфорилирования и проведения сигнала при связывания с белками семейства B7 [37]. В результате взаимодействия B7 с CD28 происходит формирование «второго» сигнала, запуск пролиферации Т-клеток и синтеза цитокинов (в первую очередь, IL-2), а также усиление выживаемости Т-клеток за счет экспрессии анти-апоптотических белков, включая Bcl-X_L [38]. Именно поэтому подавляющее большинство «наивных» Т-клеток и Т-клеток центральной памяти, единственным ответом которых на специфическую активацию Т-клеточного рецептора является пролиферация, несут на своей поверхности CD27 и CD28.

С развитием приборной базы и появлением широкого спектра флуорохромов широкому кругу исследователей стали доступны проточные цитофлуориметры, которые позволяют одновременно анализировать все указанные выше поверхностные антигены на одной клетке [3]. При этом в нашей стране можно отметить увеличение числа работ, в которых используется многоцветная проточная цитометрия, в том числе и для анализа отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов в клинике различных заболеваний. Так, роль Т-клеток различного уровня дифференцировки активности исследуется при таких аутоиммунных патологиях, как рассеянный склероз [5] и ревматоидный артрит [4]. Столь же существенное внимание уделяется анализу иммунных механизмов защиты, опосредованных цитотоксическими Т-клетками и Т-хелперами, при инфекционных заболеваниях, к числу которых относятся энтеровирусные инфекции [10], инфекции, вызванные вирусом гриппа [11] и хронический гепатит С [12]. Вместе с тем остается нерешенным вопрос о том, каких алгоритмов выявления целевых популяций следует придерживаться при анализе уровня дифференцировки цитотоксических Т-клеток [6]. Именно поэтому **целью данной работы** стало сравнение двух основных тактик «гейтирования», применяемых для анализа CD3⁺CD8⁺ с использованием антител против CD27, CD28, CD45RA и CD62L, а также разработка нормативных показателей по выявляемым субпопуляциям цитотоксических Т-лимфоцитов для дальнейшего применения в клинических исследованиях.

Материалы и методы

Объектом исследования служила венозная кровь, полученная путем пункции периферической вены и собранная в вакуумные пробирки с добавлением K₃ЭДТА. Образцы были получены в отделениях переливания крови ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения России и ФГБУ РосНИИГТ ФМБА России, за что авторы выражают искреннюю благодарность руководству и сотрудникам этих учреждений. Все исследования проводились в день взятия крови. В рамках данного исследования было обследовано 110 условно здоровых доноров (59 мужчин и 51 женщина) в возрасте 18–65 лет, 35 лет (25; 45). Подготовку образцов для проведения цитофлуориметрического учета проводили в соответствии с рекомендациями, приведенными в [1]. Для выявления основных популяций цитотоксических Т-клеток применялась следующая панель моноклональных антител, конъюгированных с различными флуорохромами (все антитела производства Beckman Coulter, США): CD62L-ECD (клон DREG56, кат. № IM2713U), CD3-APC (клон UCNT1, кат. № IM2467), CD8-APC-Alexa Fluor 700 (клон B9.11, кат. № A66332), CD45RA-APC-Alexa Fluor 750 (клон 2H4LDH11LDB9 (2H4), кат. № A86050), CD4-Pacific Blue (клон 13B8.2, кат. № A82789), CD45-Krome Orange (клон J.33, кат. № A96416). Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований, изложенных в литературе [9, 26]. Удаление эритроцитов из образцов проводили по безотмывочной технологии с использованием лизирующего раствора VersaLyse Lysing Solution (кат. № A09777), к 975 мкл которого *ex tempore* добавляли 25 мкл фиксирующего раствора IOtest 3 Fixative Solution (кат. № A07800). Абсолютные значения были получены в одноплатформенной системе с помощью реагента FlowCount™ (Beckman Coulter, США). Анализ образцов проводили на проточном цитофлуориметре Navios™ (Beckman Coulter, США), оснащенном тремя диодными лазерами 405, 488 и 638 нм. Обработку цитофлуориметрических данных проводили при помощи программ Navios Software v.1.2 и Kaluza™ v.1.2 (Beckman Coulter, США). Статистическую обработку проводили при помощи программ-

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ПОМОЩИ ПОЭТАПНОГО «ГЕЙТИРОВАНИЯ» НА ОСНОВАНИИ ПЕРВОНАЧАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ CD45RA И CD62L С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЦЕНКОЙ ЭКСПРЕССИИ CD27 И CD28 НА КЛЕТКАХ С ФЕНОТИПАМИ CD45RA⁺CD62L⁻ И CD45RA⁺CD62L⁺

Основные популяции цитотоксических Т-клеток периферической крови	Относительное содержание, % от CD3 ⁺ CD8 ⁺		Абсолютное содержание, клетки / μL крови	
	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)
CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (N)	30,25±1,49	27,71 (18,43-40,40)	135±8	128 (71-170)
CD45RA ⁻ CD62L ⁺ (CM)	10,96±0,59	9,62 (6,85-13,22)	50±3	39 (29-57)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ (EM):	35,19±1,16	34,24 (25,54-43,49)	166±9	153 (94-206)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁺ (EM1)	18,90±0,77	17,88 (12,91-23,96)	86±5	70 (53-107)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁻ (EM2)	4,76±0,22	4,32 (2,99-5,72)	22±1	20 (13-28)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁻ CD28 ⁻ (EM3)	9,15±0,85	6,22 (2,45-14,73)	47±5	24 (13-68)
CD45RA ⁻ CD62L ⁻ CD27 ⁻ CD28 ⁺ (EM4)	2,37±0,18	1,93 (1,31-2,71)	11±1	8 (6-13)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ (TEMRA):	23,75±1,26	22,96 (12,63-31,09)	114±8	91 (46-164)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁺ (pE1)	3,31±0,27	2,54 (1,81-3,72)	14±1	11 (8-17)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ CD27 ⁺ CD28 ⁻ (pE2)	4,93±0,37	3,76 (2,82-6,13)	23±2	16 (11-27)
CD45RA ⁺ CD62L ⁻ CD27 ⁻ CD28 ⁻ (E)	15,32±1,10	14,80 (5,54-21,75)	75±6	58 (19-120)

ТАБЛИЦА 2. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ Т-ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, ПОЛУЧЕННЫЕ ПРИ ПОМОЩИ ПОЭТАПНОГО «ГЕЙТИРОВАНИЯ» НА ОСНОВАНИИ ПЕРВОНАЧАЛЬНОЙ ОЦЕНКИ ЭКСПРЕССИИ CD27 И CD28 С ПОСЛЕДУЮЩЕЙ ОЦЕНКОЙ ЭКСПРЕССИИ CD45RA И CD62L НА КЛЕТКАХ С ФЕНОТИПОМ CD27⁺CD28⁺

Основные популяции цитотоксических Т-клеток периферической крови	Относительное содержание, % от CD3 ⁺ CD8 ⁺		Абсолютное содержание, клетки / μL крови	
	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)	X±s	Me (Q ₂₅ -Q ₇₅)
CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁺ CD62L ⁺ (N)	29,86±1,47	28,78 (18,88-39,84)	131±7	126 (67-170)
CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁺ (CM)	11,88±0,57	11,07 (7,80-14,37)	53±3	45 (33-67)
CD27 ⁺ CD28 ⁺ CD45RA ⁻ CD62L ⁻ (TM)	19,33±0,78	18,73 (13,29-23,43)	87±5	73 (52-110)
CD27 ⁺ CD28 ⁻ (EM):	11,01±0,53	10,07 (7,53-12,55)	52±4	42 (29-57)
CD27 ⁻ CD28 ⁻ (E)	23,86±1,58	23,15 (8,44-35,41)	119±10	88 (28-178)

ного обеспечения Statistica 8.0 (StatSoft, США). Результаты, полученные в ходе исследования абсолютного и относительного содержания цитотоксических Т-клеток в периферической крови, приводили в таблицах в виде среднего (X) и ошибки среднего (s), а также медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q_{25} и Q_{75}). Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену (r).

Результаты и обсуждение

На рисунке 1 приведены два основных подхода к анализу уровня дифференцировки цитотоксических Т-клеток периферической крови при помощи многоцветной проточной цитофлуориметрии. Оба способа базируются на использовании антител против CD27, CD28, CD45RA и CD62L, но существенное различие между ними заключается в поэтапном выделении целевых субпопуляций или «тактике гейтирования» клеток. Первый подход (рис. 1А-В) исходит из того, что основными маркерами или поверхностными антигенами, характеризующими уровень зрелости клеток, являются CD45RA и CD62L, тогда как экспрессия костимулирующих молекул CD27 и CD28 применяется лишь для более детального анализа клеток эффекторной памяти (ЕМ) и «терминально-дифференцированных» CD45RA-позитивных эффекторов (TEMRA). Второй подход основан на определении сначала уровня CD27 и CD28, тогда как наличие CD45RA и/или CD62L является «вторичным» и применяется для выявления «не эффекторных» субпопуляций цитотоксических Т-клеток, к числу которых относятся «наивные» клетки, клетки центральной памяти (СМ) и «промежуточные» или «транзиторные» клетки памяти (ТМ).

При сравнении двух приведенных на рисунке 1 «тактик» определения основных субпопуляций цитотоксических Т-лимфоцитов различного уровня дифференцировки можно отметить, что выявляемые при помощи этих двух разных подходов «наивные» клетки и клетки центральной памяти соответствуют друг другу примерно на 98-99%, о чем свидетельствуют результаты, приведенные в таблицах 1 и 2. Что же касается клеток эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻, то при использовании «тактики», основанной на экспрессии CD27 и CD28, они распределяются в зависимости

от экспрессии этих последних антигенов. Так, популяция ЕМ1 целиком входит в состав клеток памяти ТМ, а популяция ЕМ2 будет находиться в составе клеток ЕМ (ЕМ, фенотип CD27⁺CD28⁻, рис.1Г), тогда как ЕМ3 будет являться частью популяции «терминально-дифференцированных» клеток (ТД, фенотип CD27⁻CD28⁻, рис. 1Д). Однако клетки ЕМ4 с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻CD27⁻CD28⁺ вообще не учитываются в рамках второго описываемого подхода. Лимфоциты субпопуляции TEMRA будут распределяться примерно аналогичным образом, исходя из уровней экспрессии CD27 и CD28. Клетки с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁺CD28⁺ или «пре-эффекторы 1 типа» не будут учитываться в рамках второго подхода, так как в популяции CD27⁺CD28⁺ фенотип CD45RA⁺CD62L⁻ просто не предусмотрен. «Пре-эффекторы 2 типа» на основании экспрессии CD27 при отсутствии CD28 будут полностью входить в состав клеток эффекторной памяти ЕМ (ЕМ с фенотипом CD27⁺CD28⁻, рис.1Г), тогда как зрелые эффекторные клетки будут находиться в составе популяции ТД.

При проведении обратного сравнения было показано, что «наивные» клетки и клетки центральной памяти, выявленные на основании экспрессии сначала CD27 и CD28, а потом еще и CD45RA и CD62L, будут полностью соответствовать аналогичным популяциям клеток, выявленным только на основании CD45RA и CD62L. Это связано с тем, что подавляющее большинство CD45RA⁺CD62L⁺ и CD45RA⁻CD62L⁺Т-лимфоцитов экспрессируют обе костимуляционные молекулы [33]. «Переходные» клетки памяти ТМ с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻ соответствовали субпопуляции ЕМ1. Цитотоксические Т-клетки эффекторной памяти, выявленные только на основании экспрессии CD27 (при отсутствии CD28), представляли из себя весьма гетерогенную популяцию. Они формировались из клеток ЕМ2 и «пре-эффекторов 2 типа», входивших в состав ЕМ и TEMRA, выделенных при помощи антител против CD45RA и CD62L. Это также подтверждается результатами суммирования значений относительного или абсолютного содержания ЕМ2 и рЕ2, приведенных в таблицах 1 и 2. Что же касается субпопуляции зрелых эффекторных или ТД клеток, то полученные для них значения соответствуют таковым субпопуляций ЕМ3 и Е, выявляемых в рамках клеток эффекторной памяти и TEMRA.

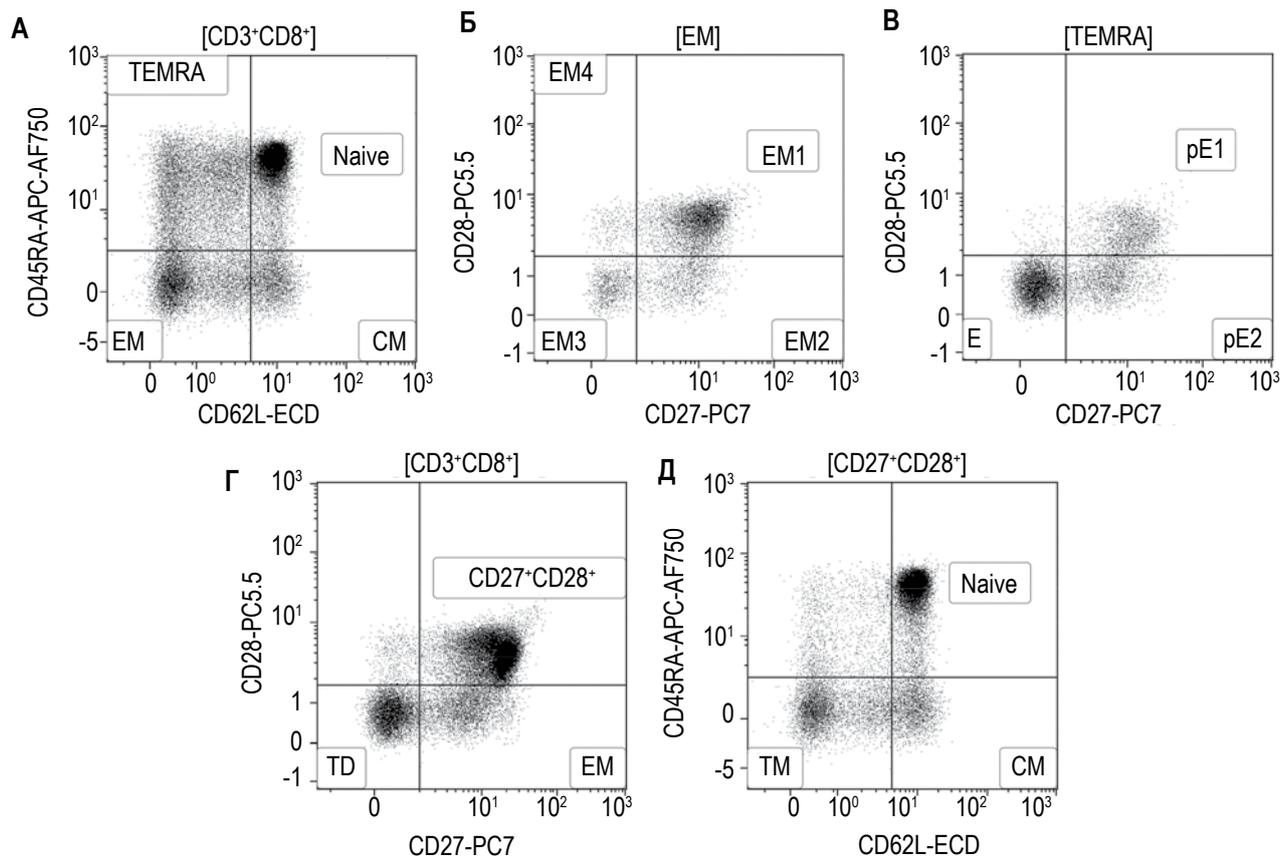


Рисунок 1. Выявление основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови с использованием антител против CD27, CD28, CD45RA и CD62L

Примечание. Гистограммы А-В – тактика поэтапного «гейтирования», основанная на первоначальной оценке экспрессии CD45RA и CD62L (гистограмма А), с последующей оценкой уровня экспрессии CD27 и CD28 клетками популяций EM (CD45RA⁺CD62L⁻) и TEMRA (CD45RA⁺CD62L⁻), гистограммы Б и В соответственно. Гистограмма А (приведены все цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD8⁺) – выделены «наивные» клетки (naïve), клетки центральной (CM) и эффекторной (EM) памяти, а также «терминально-дифференцированные» CD45RA-позитивные эффекторные клетки (TEMRA). Гистограмма Б (приведены только клетки субпопуляции EM гистограммы А) – распределение цитотоксических Т-клеток эффекторной памяти по популяциям EM1, EM2, EM3 и EM4. Гистограмма В (приведены только клетки субпопуляции TEMRA гистограммы А) – распределение клеток TEMRA по популяциям «пре-эффекторов» 1 типа (pE1), «пре-эффекторов» 2 типа (pE2) и эффекторных (E) клеток.

Гистограммы Г-Д – тактика поэтапного «гейтирования», основанная на первоначальной оценке экспрессии CD27 и CD28 (гистограмма Г), с последующей оценкой уровня экспрессии CD45RA и CD62L цитотоксическими Т-клетками популяций CD27⁺CD28⁺ (гистограммы Д). Гистограмма Г (приведены все цитотоксические Т-клетки с фенотипом CD3⁺CD8⁺) – выделены субпопуляции CD27⁺CD28⁺ клеток, клеток эффекторной памяти (EM) и «терминально-дифференцированных» эффекторных клеток (TD). Гистограмма Д (приведены только клетки субпопуляции CD27⁺CD28⁺ гистограммы Г) – выделены «наивные» клетки (naïve), клетки центральной памяти (CM) и «промежуточные» или «транзитные» (TM) клетки памяти. Видно, что клетки с фенотипом CD27⁺CD28⁺ гистограммы Г и CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁻ гистограммы Д обнаруживаются в периферической крови, но не имеют собственных наименований в рамках данного способа определения основных стадий дифференцировки цитотоксических Т-клеток.

В основе первого подхода к выявлению ключевых стадий дифференцировки цитотоксических Т-клеток периферической крови находится оценка уровня экспрессии CD45RA и CD62L (CCR7), предложенная Sallusto и соавторами в 1999 году [35]. В том случае, если Т-клетка несет оба поверхностных антигена, то она является «наивной». Эти клетки экспрессируют обе стимуляционные молекулы CD27 и CD28, способны

к пролиферации *in vitro* в ответ на различные митогены, а спектр синтезируемых молекул сводится, в первую очередь, к продукции ИЛ-2. Более того, «наивные» CD3⁺CD8⁺ клетки лучше отвечали на стимуляцию TNFα и ИЛ-6, а клетки эффекторной памяти – на стимуляцию ИЛ-10 и ИЛ-12 в условиях *in vitro* [20]. Вместе с тем другой группой исследователей была показана способность «наивных» цитотоксических Т-клеток не толь-

ко отвечать пролиферацией на внесение в среду ИЛ-15, но и дифференцироваться в эффекторные клетки [17].

Для Т-клеток центральной памяти характерно наличие на поверхностной мембране CD45R0 (вместо CD45RA), CD62L, CD27, CD28 и некоторых других. Принципиальным отличием этих клеток от «наивных» является то, что они уже прошли антиген-зависимую дифференцировку во вторичных лимфоидных органах. Наличие же CD62L позволяет отличить данную популяцию от клеток эффекторной памяти с фенотипом CD45RA⁻CD62L⁻. Данная особенность клеток CM позволяет им длительное время циркулировать по организму и определяет их преимущественную локализацию во вторичных лимфоидных органах. Высокий уровень экспрессии CD27 и CD28 позволяет им (при наличии повторной стимуляции специфическим антигеном и лигандов для указанных выше молекул на мембране АПК) им быстро активироваться и сформировать клон антиген-специфических цитотоксических Т-клеток [22]. Кроме того, клетки центральной памяти более эффективно секретируют ИЛ-2, тогда как клетки эффекторной памяти – эффекторные цитокины [29].

Было показано (табл. 1), что в периферической крови условно здоровых доноров среди цитотоксических Т-лимфоцитов доминируют клетки с фенотипами CD45RA⁺CD62L⁺ (в среднем около 30% от общего числа CD3⁺CD8⁺ клеток) и CD45RA⁻CD62L⁻ (в среднем около 35%). Клетки TEMRA составляют около одной четверти от всех цитотоксических Т-лимфоцитов, тогда как на субпопуляцию CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов центральной памяти приходится около 10% от общего числа циркулирующих цитотоксических Т-клеток. Полученные нами значения для условно здоровых доноров в целом соответствуют как ранее полученным собственным результатам [8], так и данным, приводимым в литературе [36, 40]. Проведение корреляционного анализа выявило зависимость между возрастом обследованных доноров и содержанием некоторых субпопуляций CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов в периферической крови. Следует отметить, что нами не было обнаружено взаимосвязи между возрастом и абсолютным содержанием цитотоксических Т-клеток ($r = 0,057$ при $p = 0,561$). Вместе с тем обнаружена значительная обратная зависимость между возрастом и уровнем «наивных» CD3⁺CD8⁺ клеток в периферической крови (для относительных

значений $r = -0,646$ при $p < 0,001$, а для абсолютных – $r = -0,562$ при $p < 0,001$). По мере связанного с возрастом уменьшения в циркуляции клеток с фенотипом CD45RA⁺CD62L⁺ наблюдалось увеличение относительного содержания цитотоксических Т-клеток центральной памяти ($r = 0,376$ при $p < 0,001$). Также умеренная положительная взаимосвязь наблюдалась между возрастом обследованных лиц и содержанием TEMRA цитотоксических Т-клеток, когда коэффициенты корреляции составили 0,357 при $p < 0,001$ и 0,338 при $p < 0,001$ для относительного и абсолютного содержания соответственно.

Что же касается клеток эффекторной памяти, то в последнее время на основании экспрессии CD27 и CD28 их принято разделять на четыре подтипа – EM1, EM2, EM3 и EM4, с фенотипами CD27⁺CD28⁺, CD27⁺CD28⁻, CD27⁻CD28⁻ и CD27⁻CD28⁺ соответственно [33]. В целом по мере утраты костимулирующих молекул снижается способность клеток к пролиферации, уменьшается длина теломеров и уровень продукции анти-апоптотических белков, но повышается уровень синтеза эффекторных цитокинов, идет накопление цитолитических молекул в цитоплазматических гранулах [6]. При анализе субпопуляционного состава цитотоксических Т-лимфоцитов эффекторной памяти было показано, что около половины клеток данной популяции экспрессируют CD27 и CD28 (примерно 20% от общего числа циркулирующих CD3⁺CD8⁺), что позволяет их рассматривать в качестве самой «незрелой» популяции среди EM. Примерно в два раза меньше клеток приходится на популяцию EM3, не несущих на своей поверхности обеих костимуляционных молекул и являющихся самой «зрелой» или «эффекторной» группой клеток в рамках EM. На «промежуточные» формы – экспрессирующие либо CD27, либо CD28 – приходится около 5% и 2,5% клеток от общего пула циркулирующих CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов периферической крови соответственно. Также было отмечено, что с возрастом постепенно увеличивается содержание клеток эффекторной памяти «зрелого» эффекторного фенотипа ($r = 0,474$ при $p < 0,001$ для относительного и $r = 0,435$ при $p < 0,001$ для абсолютного содержания EM3). Таким образом, возрастные изменения в рамках общего пула CD3⁺CD8⁺ клеток эффекторной памяти могут быть связаны в первую очередь именно с накоплением EM3. При этом влияние возраст на динамику относительного и абсолют-

ного содержания клеток EM1 отмечено не было ($r = 0,018$ при $p = 0,852$ и $r = 0,008$ при $p = 0,934$ соответственно).

Одна из первых попыток разделить TEMRA цитотоксические Т-клетки на отдельные субпопуляции и изучить их функциональную активность в условиях *in vitro* была предпринята в 2003 году Rufeg и соавторами [34]. По результатам проведенного исследования клетки с фенотипом $CD3^+CD8^+CD45RA^+CCR7^-$ были разделены на три субпопуляции, исходя из уровня экспрессии CD27 и CD28: «пре-эффекторы» 1 типа (pE1), ко-экспрессирующие CD27 и CD28, «пре-эффекторы» 2 типа (pE2), экспрессирующие только CD27, и «зрелые» эффекторы (E), не несущие обеих молекул на своей поверхности. При этом увеличение эффекторного потенциала (наличие перфорина, гранзимы В, экспрессия CD94) и чувствительности к действию проапоптотических факторов, а также снижение пролиферативной активности наблюдалось при переходе клеток $pE1 \rightarrow pE2 \rightarrow E$. Большая часть цитотоксических Т-клеток субпопуляции TEMRA условно здоровых доноров (более 60% от TEMRA или 15% от всех $CD3^+CD8^+$) находится на финальных стадиях дифференцировки, для которых характерно отсутствие CD27 и CD28 на плазматической мембране. Тогда как на менее зрелые клетки субпопуляций pE1 и pE2 приходится менее 20% от TEMRA или 3-4% от общего количества цитотоксических Т-клеток, обнаруженных в периферической крови. При этом на фоне увеличения возраста обследованных доноров наблюдалось возрастание как относительного ($r = 0,393$ при $p < 0,001$), так и абсолютного ($r = 0,375$ при $p < 0,001$) содержания эффекторных клеток в периферической крови.

В основе второй классификации находится определение уровня экспрессии двух костимуляционных молекул – CD27 и CD28, которые были впервые использованы для этих целей в 2002 году [16]. Исходно данный подход применялся для разделения вирус-специфических цитотоксических Т-клеток на отдельные субпопуляции в зависимости от их эффекторных свойств. Так, $CD27^+CD28^+$ цитотоксические Т-клетки практически не экспрессировали лигандов для рецепторов семейства Fas, а в их цитоплазматических гранулах не обнаруживались основные эффекторные цитолитические молекулы перфорин и гранзимы, что и послужило основанием для рассмотрения этих клеток в качестве самых «незрелых»

$CD3^+CD8^+$ лимфоцитов, находящихся на ранних стадиях дифференцировки [17]. По мере снижения экспрессии CD27 и CD28 эффекторный потенциал клеток постепенно возрастал. На основании проведенных авторами исследований $CD27^+CD28^-$ клетки получили название «промежуточных», тогда как $CD27^-CD28^-$ цитотоксические Т-клетки стали рассматриваться в качестве самых зрелых или находящихся на «поздних» стадиях созревания. Однако последняя из упомянутых выше популяций $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов тоже оказалась весьма гетерогенной, поэтому для выявления эффекторных клеток было предложено использовать еще один поверхностный антиген – CD45RA, экспрессия которого обнаруживается как на «наивных», так и «терминально-дифференцированных» клетках. Использование CD45RA в качестве дополнительного маркера эффекторных или «терминально-дифференцированных» цитотоксических клеток базируется на исследованиях Namann и соавторов, которыми была обнаружена способность $CD8^+CD45RA^+CD27^-$ клеток проявлять цитолитические свойства без дополнительной предварительной стимуляции *in vitro* [21]. В рамках этой работы было показано, что клетки с фенотипом $CD45RA^+CD27^+$ и $CD45RA^+CD27^-$ различаются по уровню экспрессии нескольких важнейших антигенов, определяющих миграционную способность клеток. Так, CD62L был ярко представлен только на первой из упомянутых популяций, что указывало на способность этих клеток к миграции в лимфоидную ткань, тогда как CD49d, CD49e, CD29, CD11a/CD18 и CD58 – отвечающие за миграцию на периферию – экспрессировались в основном $CD45RA^+CD27^-$. С другой стороны, среди популяции $CD27^+CD28^+$ цитотоксических Т-клеток были обнаружены лимфоциты, способные к специфическому распознаванию вируса гриппа А, некоторых антигенных эпитопов цитомегаловируса и т.д. [39]. Накопление этих данных явилось предпосылкой для более детального разделения цитотоксических Т-клеток с фенотипом $CD27^+CD28^+$ на отдельные субпопуляции на основании не только экспрессии CD45RA, но и CD62L и/или CD62L, что было предложено Sallusto и соавторами в 1999 году [35]. Таким образом, в единое целое объединились две группы общепринятых маркеров, но уже в рамках второй классификации. Причем применение CD45RA/CD45R0 и CD62L/CCR7 носило «подчиненный» характер по отношению к костимуляционным

молекулам CD27 и CD28. Такое слияние привело к описанию фенотипа «наивных» клеток как CD27⁺CD28⁺CD45RA⁺CD62L⁺, а клеток центральной памяти — как CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺. Более того, появилась еще одна дополнительная субпопуляция клеток, получившая название «переходных» или «транзиторных» клеток памяти (ТМ), которые не несли на своей поверхности CD45RA и CD62L, но все еще экспрессировали обе костимуляционные молекулы [19]. По своим функциональным характеристикам, проявляемым в условиях *in vitro*, и фенотипу эти клетки занимали промежуточное положение между клетками центральной и эффекторной памяти [30]. Несмотря на то, что эта популяция была исходно описана среди Т-хелперов, определение уровня цитотоксических Т-клеток с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻ происходит абсолютно аналогичным образом [18]. Более того, особый интерес к CD3⁺CD8⁺ лимфоцитам данной популяции появился в настоящее время, когда было показано, что цитотоксические Т-клетки именно этой стадии дифференцировки обладают наиболее выраженной супрессорной активностью в отношении репликации вируса иммунодефицита человека [23].

Полученные нами результаты указывают на то, что в периферической крови условно здоровых доноров «наивные» и зрелые эффекторные клетки представлены на примерно одинаковом уровне и составляют около одной трети и одной четверти от CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов соответственно (табл. 2). На клетки центральной памяти с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁺ и клетки эффекторной памяти с фенотипом CD27⁺CD28⁻ приходится примерно по 11% от общего пула цитотоксических Т-клеток. Оставшиеся примерно 20% составляют так называемые «переходные» и «транзиторные» CD3⁺CD8⁺ лимфоциты с фенотипом CD27⁺CD28⁺CD45RA⁻CD62L⁻. Анализ изменений, связанных с возрастом обследованных условно здоровых доноров, затрагивал в первую очередь «наивные» клетки. Была выявлена значительная обратная взаимосвязь между относительным ($r = -0,638$ при $p < 0,001$) и абсолютным ($r = -0,530$ при $p < 0,001$) содержанием цитотоксических Т-лимфоцитов этой субпопуляции и возрастом обследованных лиц. Более того, по мере увеличения возраста наблюдалось возрастание в периферической крови клеток с фенотипом CD27⁻CD28⁻, причем как в относительных ($r = 0,495$ при $p < 0,001$), так и в абсолютных величинах ($r = 0,442$ при $p < 0,001$).

Оба подхода к анализу цитотоксических Т-клеток выявили корреляционную взаимосвязь между возрастом обследованных доноров и снижением в циркуляции лимфоцитов незрелых фенотипов при накоплении клеток с признаками зрелых эффекторных клеток. Ключевые различия преимущественно касаются популяций самых «наивных» и эффекторных клеток, тогда как уровень «промежуточных» стадий созревания CD3⁺CD8⁺ клеток в циркуляции изменяется незначительно, о чем свидетельствуют как собственные результаты, так и данные литературы [40]. Следует также отметить, что в случае отдельных субпопуляций Т-лимфоцитов EM и TEMRA, полученных при помощи последовательного «гейтирования» на основании экспрессии сначала CD45RA и CD62L, а потом CD27 и CD28, также наблюдалось возрастание относительного и абсолютного содержания эффекторных клеток по мере увеличения возраста доноров. С другой стороны, эти изменения не были отмечены для субпопуляций EM1 и pE1, которые являются малодифференцированными клетками, сохранившими способность к пролиферации среди этих эффекторных субпопуляций. Можно предполагать, что именно эти клетки являются основными источниками для поддержания численности более зрелых эффекторных цитотоксических Т-клеток в условиях периферических лимфоидных органов, тогда как численность «наивных» CD3⁺CD8⁺ с возрастом неуклонно сокращается. Обычно этот процесс связывается с изменениями, протекающими в тимусе — возрастная инволюция — как центральном органе иммунной системы [27]. Еще одним подтверждением этому является снижение в периферической крови доноров старших возрастных групп уровня циркулирующих «ранних тимических мигрантов» с фенотипом CD31⁺CD45R0⁻CD62L⁺ [24]. Также было показано, что по мере увеличения возраста пациентов уменьшалось разнообразие V β -цепей Т-клеточного рецептора на этих «наивных» CD3⁺CD4⁺ и CD3⁺CD8⁺ клетках, что существенно снижало спектр распознаваемых Т-клетками патогенов. Все это может негативно сказываться на эффективности функционирования всей системы иммунного надзора в целом, что выражается в увеличении развития онкологических и аутоиммунных патологий у лиц этой возрастной группы [32]. Более того, рост относительного и абсолютного содержания Т-клеток эффекторных субпопуляций никак не компенсирует этот

процесс, так как эти группы клеток отличаются олигоклональностью и весьма небольшим набором V β -цепей вне зависимости от возраста пациентов [28]. Столь выраженная возрастная динамика относительного и абсолютного содержания цитотоксических Т-лимфоцитов в периферической крови, а также остальные изменения, связанные с возрастом пациентов, должны учитываться при анализе нарушений функционирования иммунной системы, проводимом в диагностических целях [2].

Как свидетельствуют приведенные результаты, оба методических подхода к анализу цитотоксических Т-клеток различного уровня дифференцировки весьма похожи, но в некоторых отношениях существенно различаются, однако выбор того или иного способа обработки полученных результатов всегда остается на усмотрение авторского коллектива. При этом следует отметить, что применение подхода, основанного на первоначальном определении уровня экспрессии CD45RA и CD62L, предполагает наличие среди популяций EM и TEMRA – «эффекторных», короткоживущих и высокодифференцированных – весьма гетерогенных групп клеток. На основании результатов собственных исследований [7] и данных литературы [33, 34] можно утверждать, что в рамках указанных выше субпопуляций CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов обнаруживаются как минимум две независимые субпопуляции – EM3 и E-клеток, обладающие выраженным эффекторным фенотипом, а также две независимые

субпопуляции – EM1 и pE1, характеризующиеся полным отсутствием эффекторных свойств, но способных к пролиферации. В рамках другого подхода, в основе которого лежит анализ уровня экспрессии CD27 и CD28, отдельные клеточные популяции выстроены, на первый взгляд, вполне логично и оправданно, прослеживаются четкие переходы между всеми клеточными типами. Однако, часть цитотоксических Т-клеток (с фенотипами CD45RA⁻CD62L⁻CD27⁻CD28⁺ и CD45RA⁺CD62L⁻CD27⁻CD28⁺), составляющих около 6% от общего числа CD3⁺CD8⁺ клеток, во все не учитываются. Тогда как ряд эффекторных популяций – EM и TD – представляется гетерогенным даже на основании использованных нами маркеров в рамках этого исследования. Более того, следует упомянуть и о том, что в настоящее время существует как минимум четыре независимых и отчасти противоречащих друг другу модели формирования различных популяций эффекторных клеток и клеток памяти, каждая из которых опирается на обширный экспериментальный и/или клинический материал [6, 17, 25]. Таким образом, требуются дальнейшие поиски фенотипических и функциональных особенностей цитотоксических Т-клеток с целью выработки адекватных подходов к их классификации для дальнейшего использования в научных исследованиях и клинико-диагностической практике.

Список литературы / References

1. Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Baidun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standard technology «Flow cytometric immunophenotyping of peripheral blood lymphocytes» (draft version). *Meditsinskaya immunologia = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3. pp. 255-268. doi: 10.15789/1563-0625-2012-3-255-268 (In Russ.)]
2. Борисов А.Г., Савченко А.А., Смирнова С.В. К вопросу о классификации нарушений функционального состояния иммунной системы // Сибирский медицинский журнал, 2008. Т. 23, № 3-1. С. 13-18. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Smirnova S.V. On classification of immune system functional status injuries. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal*, 2008, Vol. 23, no. 1-3, pp. 13-18. (In Russ.)]
3. Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Кудрявцев И.В., Черешнев В.А. Проточная цитометрия в медицине и биологии. Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2013. 552 с. [Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Kudryavtsev I.V., Chereshevnev V.A. Flow cytometry in medicine and biology]. Ekaterinburg: RIO UrO RAN, 2013. 552 p.
4. Иванова И.П., Селедцов В.И., Мамаев С.В., Козлов В.А. Содержание отдельных субпопуляций Т-клеток памяти у больных ревматоидным артритом в процессе лечения Т-клеточной вакциной // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2011. № 2-2 (35). С. 25-26. [Ivanova I.P., Seledtsov V.I., Mamaev S.V., Kozlov V.A. Memory T-cells distinct subpopulations levels in rheumatoid arthritis patients during

T-cell vaccination. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2011, no. 2-2 (35), pp. 25-26. (In Russ.)]

5. Иванова И.П., Савкин И.В., Селедцова Г.В., Шишков А.А., Селедцов В.И. Фенотипические характеристики и внутриклеточные цитокины Т-клеток памяти у больных рассеянным склерозом после Т-клеточной вакцинации // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, 2012. № 3-2. С. 79-82. [Ivanova I.P., Savkin I.V., Seledtsova G.V., Shishkov A.A., Seledtsov V.I. Phenotypic characterization and intracellular cytokines of memory T-cells in multiple sclerosis patients after T-cell vaccination. *Byulleten' Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SB RAMS*, 2012, no. 3-2, pp. 79-82. (In Russ.)]

6. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 947-964. (In Russ.)]

7. Кудрявцев И.В., Борисов А.Г., Волков А.Е., Савченко А.А., Серебрякова М.К., Полевщиков А.В. Анализ уровня экспрессии CD56 и CD57 цитотоксическими Т-лимфоцитами различного уровня дифференцировки // Тихоокеанский медицинский журнал, 2015. № 2. С. 30-35. [Kudryavtsev I.V., Borisov A.G., Volkov A.E., Savchenko A.A., Serebryakova M.K., Polevshnikov A.V. CD56 and CD57 expression by distinct populations of human cytotoxic CD8⁺T-lymphocytes. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2015, no. 2, pp. 30-35. (In Russ.)]

8. Кудрявцев И.В., Елезов Д.С. Анализ основных популяций цитотоксических Т-лимфоцитов периферической крови на основании уровня экспрессии CD27, CD28, CD45R0 и CD62L // Российский иммунологический журнал, 2013. Т. 7 (16), № 2-3 (1). С. 57-61. [Kudryavtsev I.V., Elezov D.S. Analysis of the main populations of cytotoxic T lymphocytes of peripheral blood on the basis level or the expression of CD27, CD28, CD45R0 and CD62L. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2013, Vol. 7 (16), no. 2-3 (1), pp. 57-61. (In Russ.)]

9. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-19-26 (In Russ.)]

10. Лагерева Ю.Г., Черешнев В.А., Еременко А.Ю., Бейкин Я.Б. Содержание CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток памяти, наивных и терминально-дифференцированных Т-эффекторов в цереброспинальной жидкости при менингеальной форме энтеровирусной инфекции у детей // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17). № 3. С. 823-825. [Lagereva J.G., Chereshnev V.A., Eremenko A.J., Beykin J.B. CD4⁺ and CD8⁺ memory T-cells, naive and terminally differentiated T lymphocytes in cerebrospinal fluid during acute stage of enteroviral meningitis in children. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8 (17), no. 3, pp. 823-825. (In Russ.)]

11. Петухова Г.Д., Лосев И.В., Дониная С.А., Найхин А.Н. Формирование CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток иммунологической памяти у волонтеров после вакцинации живыми аттенуированными гриппозными вакцинами А (H5N2) и А (H1N1)PDM2009 // Инфекция и иммунитет, 2014. Т. 4, № 1. С. 84-85. [Petukhova G.D., Losev I.V., Donina S.A., Na'khin A.N. The formation of CD4⁺ and CD8⁺ memory T cells in volunteers blood after immunization with modified-live vaccine against flu virus A (H5N2) and A (H1N1)PDM2009. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 1, pp. 84-85. doi: 10.15789/2220-7619-2014-1-49-99 (In Russ.)]

12. Семенов А.В., Арсентьева Н.А., Елезов Д.С., Кудрявцев И.В., Эсауленко Е.В., Тотолян А.А. Особенности популяционного состава CXCR3-положительных лимфоцитов периферической крови больных хроническим вирусным гепатитом С // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2013. № 6. С. 69-76. [Semenov A.V., Arsentieva N.A., Elezov D.S., Kudryavtsev I.V., Esaulenko E.V., Totolyan A.A. Features of population composition of peripheral blood CXCR3-positive lymphocytes in chronic viral hepatitis C patients. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2013, no. 6, pp. 69-76. (In Russ.)]

13. Сохоневич Н.А., Хазиахматова О.Г., Юрова К.А., Шуплетова В.В., Литвинова Л.С. Фенотипическая характеристика и функциональные особенности Т- и В-клеток иммунной памяти // Цитология, 2015. Т. 57, № 5. С. 311-318. [Sokhonevich N.A., Khaziakhmatova O.G., Yurova K.A., Shupletsova V.V., Litvinova L.S. Phenotypic characterization and functional features of memory T- and B-cells. *Tsitologiya = Cytology*, 2015, Vol. 57, no. 5, pp. 311-318. (In Russ.)]

14. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
15. Akbar A.N., Terry L., Timms A., Beverley P.C., Janossy G. Loss of CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells. *J. Immunol.*, 1988, Vol. 140, no. 7, pp. 2171-2178.
16. Appay V., Dunbar P.R., Callan M., Klenerman P., Gillespie G.M., Papagno L., Ogg G.S., King A., Lechner F., Spina C.A., Little S., Havlir D.V., Richman D.D., Gruener N., Pape G., Waters A., Easterbrook P., Salio M., Cerundolo V., McMichael A.J., Rowland-Jones S.L. Memory CD8⁺ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat. Med.*, 2002, Vol. 8, no. 4, pp. 379-385.
17. Appay V., van Lier R.A., Sallusto F., Roederer M. Phenotype and function of human T lymphocyte subsets: consensus and issues. *Cytometry A*, 2008, Vol. 73, no. 11, pp. 975-983.
18. Badr G., Bedard N., Abdel-Hakeem M.S., Trautmann L., Willems B., Villeneuve J.P., Haddad E.K., Sekaly R.P., Bruneau J., Shoukry N.H. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J. Virol.*, 2008, Vol. 82, no. 20, pp. 10017-10031.
19. Fritsch R.D., Shen X., Sims G.P., Hathcock K.S., Hodes R.J., Lipsky P.E. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, no. 10, pp. 6489-6497.
20. Geginat J., Lanzavecchia A., Sallusto F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 11, pp. 4260-4266.
21. Hamann D., Baars P.A., Rep M.H., Hooibrink B., Kerkhof-Garde S.R., Klein M.R., van Lier R.A. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 186, no. 9, pp. 1407-1418.
22. Kambayashi T., Assarsson E., Lukacher A.E., Ljunggren H.G., Jensen P.E. Memory CD8⁺ T cells provide an early source of IFN-gamma. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 5, pp. 2399-2408.
23. Killian M.S., Johnson C., Teque F., Fujimura S., Levy J.A. Natural suppression of human immunodeficiency virus type 1 replication is mediated by transitional memory CD8⁺ T cells. *J. Virol.*, 2011, Vol. 85, no. 4, pp. 1696-1705.
24. Kohler S., Wagner U., Pierer M., Kimmig S., Oppmann B., Möwes B., Julke K., Romagnani C., Thiel A. Post-thymic *in vivo* proliferation of naive CD4⁺ T cells constrains the TCR repertoire in healthy human adults. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 6, pp. 1987-1994.
25. Larbi A., Fulop T. From «truly naïve» to «exhausted senescent» T cells: when markers predict functionality. *Cytometry A*, 2014, Vol. 85, no. 1, pp. 25-35.
26. Mahnke Y.D., Roederer M. Optimizing a multicolor immunophenotyping assay. *Clin. Lab. Med.* 2007, Vol. 27, pp. 469-485.
27. Moro-Garcia M.A., Alonso-Arias R., Lepez-Larrea C. Molecular mechanisms involved in the aging of the T-cell immune response. *Curr. Genomics*, 2012, Vol. 13, no. 8, pp. 589-602.
28. Naylor K., Li G., Vallejo A.N., Lee W.W., Koetz K., Bryl E., Witkowski J., Fulbright J., Weyand C.M., Goronzy J.J. The influence of age on T cell generation and TCR diversity. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 11, pp. 7446-7452.
29. Newell E.W., Sigal N., Bendall S.C., Nolan G.P., Davis M.M. Cytometry by time-of-flight shows combinatorial cytokine expression and virus-specific cell niches within a continuum of CD8⁺ T cell phenotypes. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 1, pp. 142-152.
30. Okada R., Kondo T., Matsuki F., Takata H., Takiguchi M. Phenotypic classification of human CD4⁺ T cell subsets and their differentiation. *Int. Immunol.*, 2008, Vol. 20, no. 9, pp. 1189-1199.
31. Picker L.J., Treer J.R., Ferguson-Darnell B., Collins P.A., Buck D., Terstappen L.W. Control of lymphocyte recirculation in man. I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor L-selectin on T cells during the virgin to memory cell transition. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 3, pp. 1105-1121.
32. Qi Q., Liu Y., Cheng Y., Glanville J., Zhang D., Lee J.Y., Olshen R.A., Weyand C.M., Boyd S.D., Goronzy J.J. Diversity and clonal selection in the human T-cell repertoire. *PNAS*, 2014, Vol. 111, no. 36, pp. 13139-13144.
33. Romero P., Zippelius A., Kurth I., Pittet M.J., Touvrey C., Iancu E.M., Corthesy P., Devivre E., Speiser D.E., Rufer N. Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 7, pp. 4112-4119.
34. Rufer N., Zippelius A., Batard P., Pittet M.J., Kurth I., Corthesy P., Cerottini J.C., Leyvraz S., Roosnek E., Nabholz M., Romero P. Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 5, pp. 1779-1787.
35. Sallusto F., Lenig D., Förster R., Lipp M., Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature*, 1999, Vol. 401, no. 6754, pp. 708-712.

36. Saule P, Trauet J, Dutriez V, Lekeux V, Dessaint J.P, Labalette M. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. *Mech. Ageing. Dev.*, 2006, Vol. 127, no. 3, pp. 274-281.
37. Sharpe A.H. Mechanisms of costimulation. *Immunol. Rev.*, 2009, Vol. 229, no. 1, pp. 5-11.
38. Sperling A.I., Auger J.A., Ehst B.D., Rulifson I.C., Thompson C.B., Bluestone J.A. CD28/B7 interactions deliver a unique signal to naive T cells that regulates cell survival but not early proliferation. *J. Immunol.*, 1996, Vol. 157, no. 9, pp. 3909-3917.
39. van Aalderen M.C., Remmerswaal E.B., ten Berge I.J., van Lier R.A. Blood and beyond: properties of circulating and tissue-resident human virus-specific $\alpha\beta$ CD8(+) T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 4, pp. 934-944.
40. van Epps P, Banks R., Aung H., Betts M.R., Canaday D.H. Age-related differences in polyfunctional T cell responses. *Immun. Ageing.*, 2014, Vol. 11, p. 14.

Авторы:

Кудрявцев И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория общей иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; отдел онкоиммунологии, ФГБУ «НИИ онкологии им. Н.Н. Петрова» Минздрава России, Санкт-Петербург; кафедра фундаментальной медицины ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

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; кафедра инфекционных болезней и эпидемиологии с курсом ПО, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

Кробинец И.И. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория изосерологии, ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт гематологии и трансфузиологии ФМБА России», Санкт-Петербург, 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; кафедра физиологии им. проф. А.Т. Пионика, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Минздрава России, г. Красноярск, Россия

Серебрякова М.К. — аспирант, научный сотрудник, отдел иммунологии, ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

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

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; Department of Infection Diseases and Epidemiology, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Krobinets I.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Isoserology, Russian Research Institute of Hematology and Transfusiology, Federal Medical and Biological Agency, St. Petersburg, 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; A.T. Pshonik's Department of Physiology, Krasnoyarsk State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Serebryakova M.K., Graduate Student, Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 13.06.2015
Принята к печати 21.09.2015

Received 13.06.2015
Accepted 21.09.2015

МУЛЬТИПЛЕКСНЫЙ АНАЛИЗ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ

**Останин А.А., Старостина Н.М., Меледина И.В., Шипунов М.В.,
Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Черных Е.Р.**

Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Цитокины играют важную роль в патогенезе цирроза печени (ЦП), детерминируя тяжесть заболевания, развитие печеночных и внепеченочных осложнений. Целью исследования являлся мультиплексный анализ 26 цитокинов, секретируемых клетками крови больных ЦП (n = 20) с учетом стадии (класс А по Child-Pugh, n = 13 и класс В+С, n = 7) и этиологии заболевания (вирусный ЦП, n = 12 и ЦП невирусной этиологии, n = 8). Группу контроля составили 10 здоровых доноров крови. Цитокин-секреторную функцию клеток оценивали в 24-часовых культурах как на уровне спонтанной продукции, так и в ответ на стимуляцию бактериальным эндотоксином (ЛПС). При анализе цитокинов, вовлеченных в патогенез воспалительного процесса, было выделено 4 функциональные группы: про-/противовоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF α , IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxin). В работе показано, что клетки крови больных ЦП являются активными продуцентами цитокинов и характеризуются повышенной секрецией цитокинов из всех 4 функциональных групп. Усиление продукции многих цитокинов ассоциировано с тяжестью ЦП и вирусной этиологией ЦП. При этом возрастание как спонтанной, так и ЛПС-стимулированной секреции цитокинов свидетельствует о сохранной реактивности клеток крови к эндотоксину. В целом полученные данные свидетельствуют о важном вкладе циркулирующих клеток крови в поддержании воспалительного ответа при ЦП и потенциальной диагностической/прогностической значимости цитокинов, продуцируемых клетками крови.

Ключевые слова: мультиплексный анализ, цитокины, хемокины, ростовые факторы, клетки крови, цирроз печени

A MULTIPLEX ASSAY OF 26 CYTOKINES SECRETED BY BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS

**Ostanin A.A., Starostina N.M., Meledina I.V., Shipunov M.V.,
Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Chernykh E.R.**

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

Abstract. Cytokines play an important role in the pathogenesis of liver cirrhosis (LC), determining the disease severity as well as hepatic and extrahepatic complications. The present study aims to characterize the

Адрес для переписки:

*Останин Александр Анатольевич
Научно-исследовательский институт фундаментальной
и клинической иммунологии
630099, Россия, г. Новосибирск, Ядринцевская ул., 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru*

Address for correspondence:

*Ostanin Alexander A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ostanin62@mail.ru; ct_lab@mail.ru*

Образец цитирования:

*А.А. Останин, Н.М. Старостина, И.В. Меледина,
М.В. Шипунов, О.Ю. Леплина, Е.Я. Шевела, Е.Р. Черных,
«Мультиплексный анализ 26 цитокинов, секретируемых
клетками крови больных циррозом печени» // Медицинская
иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 539-552.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-539-552*

© Останин А.А. и соавт., 2015

For citation:

*A.A. Ostanin, N.M. Starostina, I.V. Meledina, M.V. Shipunov,
O.Yu. Leplina, E.Ya. Shevela, E.R. Chernykh, "A multiplex
assay of 26 cytokines secreted by blood cells of patients with
liver cirrhosis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 539-552.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-539-552*

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-539-552>

cytokine profile of blood cells in 20 LC patients with regard to the stage (class A on Child-Pugh, $n = 13$, and the class B+C, $n = 7$) and the etiology of the disease (viral LC, $n = 12$ and the LC of non-viral etiology, $n = 8$) using cytokine 26-plex assay. The control group consisted of 10 healthy donors. Cytokine concentrations were tested both in spontaneous and bacterial endotoxin (LPS) stimulated 24 hour blood cultures. Four functional groups: pro-/anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , TNF α , IL-1ra, IL-10), immunoregulatory cytokines (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), growth factors (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) and chemokines (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxin) involved in the pathogenesis of inflammation, have been analyzed. The blood cells of LC patients were shown to be active producers of cytokines and were characterized by increased cytokine levels from all four functional groups. The enhancement of many cytokines was associated with the disease severity and viral etiology. The increased cytokine production in both intact and LPS-stimulated cultures indicated preserved reactivity of blood cells to endotoxin. Overall, the data obtained suggest the contribution of circulating blood cells in supporting of inflammatory response and the potential diagnostic/prognostic significance of blood cell-derived cytokines in patients with LC.

Keywords: multiplex assay, cytokines, chemokines, growth factors, blood cells, liver cirrhosis

Введение

Хронические заболевания печени с исходом в цирроз относятся к группе патологий, при которых повреждение тканей связано с хроническим воспалением. Провоспалительный статус проявляется повышенным содержанием в сыворотке крови провоспалительных цитокинов и хемокинов и является характерным для больных циррозом печени (ЦП) токсической, вирусной и аутоиммунной этиологии [9, 16, 25, 29]. Воспалительный процесс инициируется и опосредуется с участием широкого спектра цитокинов, некоторые из которых могут обладать двойственной функцией, т.е. способны оказывать как протективное, так и повреждающее действие. Однако на конечной стадии хронических заболеваний повышенный уровень различных функциональных классов цитокинов связывают преимущественно с их повреждающим действием, в частности поддержанием локального и системного воспаления, апоптотической гибелью гепатоцитов, прогрессией фиброза и развитием внепеченочных осложнений [18, 25].

Источником цитокинов при ЦП являются клетки печени, включая гепатоциты, звездчатые клетки, эндотелиальные клетки, а также резидентные и рекрутируемые клетки иммунной системы (макрофаги и Т-клетки). Кроме того, значительный вклад в изменение уровня цитокинов в циркуляции могут вносить периферические клетки иммунной системы, активированные через Toll-like рецепторы (TLRs) патоген-ассоциированными молекулярными структурами в результате транслокации кишечной флоры [4, 15].

Значение воспалительного ответа в патогенезе ЦП подтверждается ассоциацией между концентрацией некоторых провоспалительных ци-

токинов и хемокинов с характером прогрессии и тяжестью заболевания, развитием внутрипеченочных (стеатоза, цирроза, гепатоцеллюлярной карциномы) и внепеченочных (атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, когнитивные нарушения) осложнений [8, 13, 33], особенно энцефалопатии [14, 22]. Действительно, подавление TNF α у пациентов с тяжелыми формами алкогольной болезни печени с помощью пентоксифилина или моноклональных анти-TNF α антител показали клиническую эффективность [3, 31]. Соответственно, цитокины могут обладать прогностической значимостью и являться мишенями для терапевтических воздействий, что обуславливает важность их изучения при ЦП.

Несмотря на этот очевидный факт, комплексные исследования, затрагивающие одновременную оценку различных функциональных классов цитокинов, до сих пор не проводились. Это отчасти обусловлено тем, что в большинстве работ цитокины определяются в сыворотке крови, где многие из них идентифицируются на уровне пороговых значений. Поэтому анализируется весьма ограниченный спектр цитокинов, что не позволяет ответить на вопрос, имеется ли взаимосвязь между изменением отдельных функциональных групп цитокинов. Ограниченный спектр цитокинов проанализирован и в аспекте сопряженности с тяжестью и/или этиологией цирроза печени.

Поэтому настоящее исследование было посвящено комплексной характеристике различных функциональных классов цитокинов при ЦП с учетом стадии и этиологии заболевания. В качестве источника цитокинов исследовали клетки периферической крови, которые представляют физиологическую модель изучения интегрального периферического иммунного ответа *ex vivo*. Учитывая феномен транслокации

бактериальной флоры при ЦП, культуры клеток цельной крови представляются удобным источником не только для анализа спонтанной продукции цитокинов, но и для исследования феномена ЛПС-анергии [26]. Данные о реактивности моноцитов крови к повторной стимуляции эндотоксином остаются неоднозначными [20, 30], поэтому одновременная оценка спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции цитокинов клетками крови позволяет охарактеризовать их реактивность к эндотоксину.

Материалы и методы

В исследование были включены 10 здоровых доноров крови (5 мужчин и 5 женщин, средний возраст 45 лет) и 20 больных ЦП – 10 мужчин и 10 женщин, средний возраст 50 лет. Диагноз хронического гепатита с исходом в ЦП устанавливали на основании данных клинического, лабораторного и гистологического анализа. В соответствии с классификацией цирроза печени по Child-Pugh класс А диагностировался у 13 (65%), класс В у 6 (30%) пациентов и класс С у 1 (5%) больного. Причиной ЦП в 60% случаев (12/20) являлся хронический вирусный гепатит С. Оставшиеся 40% случаев (8/20) были представлены ЦП невирусной этиологии, включая токсический ЦП (n = 4); аутоиммунный ЦП (n = 2); первичный билиарный ЦП (n = 1); и первичный билиарный ЦП в сочетании с аутоиммунным компонентом (n = 1). При этом следует отметить, что подгруппы больных ЦП вирусной и невирусной этиологии были сопоставимы между собой по тяжести заболевания (частота больных с ЦП класса В+С в подгруппах составляла 42 и 25% соответственно; $r_{\text{ТМФ}} = 0,64$). Так же как и подгруппы больных с классом А и классом В+С по Child-Pugh не различались между собой по этиологии заболевания (частота больных ЦП вирусной этиологии в подгруппах составляла 54 и 71% соответственно; $r_{\text{ТМФ}} = 0,64$). Исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных и были одобрены решением Локального этического комитета.

Больные ЦП были обследованы до начала комплексной терапии. Забор венозной и капиллярной крови проводили утром натощак по общепринятым правилам. Общий анализ крови осуществляли на гемоанализаторе «HEMA-Screen 13» (Швейцария – Италия).

Продукцию цитокинов определяли в культурах клеток цельной крови. Для этого гепаринизированную (20 ЕД/мл) венозную кровь разводили в 5 раз средой RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера и 100 мкг/мл гентамицина,

и культивировали в течение 24 ч в круглодонных, стерильных пробирках в присутствии липополисахарида (ЛПС, *Escherichia coli* 0111:B4, Sigma-Aldrich, США) в конечной концентрации 10 мкг/мл, а также в отсутствие митогенной стимуляции (спонтанная продукция). Культивирование проводили при 37 °С в CO₂-инкубаторе, после чего собирали супернатанты и хранили полученные образцы при -80 °С до тестирования.

Концентрацию 26 цитокинов (IL-1 β , IL-1ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, Eotaxin, FGF-basic, G-CSF, IFN γ , IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-BB, RANTES, TNF α , VEGF) в супернатантах цельной крови оценивали методом проточной флюориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием коммерческих тест-систем в соответствии с инструкцией фирмы-производителя [1, 7]. Полученные значения пересчитывали индивидуально с учетом абсолютного количества лейкоцитов и выражали в пг/мл/10⁶ лейкоцитов.

Математическую обработку данных проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0 (StatSoft). Для оценки достоверности различий использовали точный критерий Фишера (для дискретных переменных) и непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни (для сравнения непрерывных переменных). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Для оценки различий по уровню какого-либо признака между несколькими (> 2) выборками проводили дисперсионный однофакторный анализ с использованием непараметрического H-критерия Краскела–Уоллиса.

Результаты

Для исследования цитокин-секреторной активности клеток крови больных ЦП нами был использован методический прием, основанный на оценке уровня спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции 26 цитокинов в культурах цельной крови. Использование цельной крови имеет несколько очевидных преимуществ [32]. Во-первых, этот метод не требует выделения клеток-продуцентов, что, соответственно, устраняет вероятность их неспецифической активации на этапах сепарации. Во-вторых, оценка цитокин-секреторной функции клеток происходит в их естественном микроокружении, при котором сохраняется существующий *in vivo* баланс как различных типов клеток крови, так и гуморальных факторов. Следовательно, оценка продукции цитокинов максимально приближа-

ется к условиям *in vivo*. Тем не менее, полученные значения уровня цитокинов (пг/мл) в 24-часовых супернатантах цельной крови необходимо стандартизировать по количеству клеток-продуцентов (например, лейкоцитов), для того чтобы нивелировать различия обследуемых лиц (здоровых доноров и больных ЦП) по абсолютному лейкоцитозу.

Оценка уровня спонтанной (базальной) продукции цитокинов показала (рис. 1), что клетки крови как здоровых доноров, так и больных ЦП активно секретируют широкий спектр различных медиаторов, однако средний уровень их продукции отличается значительной вариабельностью. Так, часть цитокинов (IL-6) и хемокинов (IL-8, MCP-1, MIP-1 β , RANTES) секретируется на достаточно высоком уровне (> 400 пг/мл/10⁶ лейкоцитов). Оставшиеся хемокины (IP-10, MIP-1 α , Eotaxin), а также IFN γ , отдельные ростовые факторы (PDGF), про- и противовоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF α и IL-1ra) хорошо детектируются в диапазоне от 20 до 400 пг/мл/10⁶ лейкоцитов. При этом базальная секреция относительно большой подгруппы цитокинов и ростовых факторов (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9,

IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, FGF- β , G-CSF, VEGF) не превышает уровня 20 пг/мл/10⁶ лейкоцитов.

По сравнению со здоровыми донорами у больных ЦП отмечалась отчетливая тенденция к увеличению спонтанной продукции IL-6, TNF α и IL-1ra, а также всех хемокинов, которая в отношении MIP-1 β и IP-10 достигала статистически значимого уровня ($p < 0,05$ и $p < 0,01$ соответственно). Кроме того, клетки крови больных ЦП более активно секретируют IL-4, IL-5, IL-9 и FGF- β ($p < 0,05$), хотя и в этом случае уровень продукции оставался относительно низким (менее 20 пг/мл/10⁶ лейкоцитов).

Из данных таблицы 1 видно, что повышенная спонтанная продукция MIP-1 β и IP-10 обнаруживалась у больных независимо от степени тяжести или этиологии ЦП. В то же время по сравнению с донорами в подгруппе больных ЦП класса В+С дополнительно регистрировалось статистически значимое увеличение уровня секреции и других хемокинов (IL-8, RANTES, Eotaxin), а также IL-17, FGF- β и IL-9. При этом продукция IL-9 была достоверно выше не только по сравнению с донорами, но и с больными ЦП класса А.

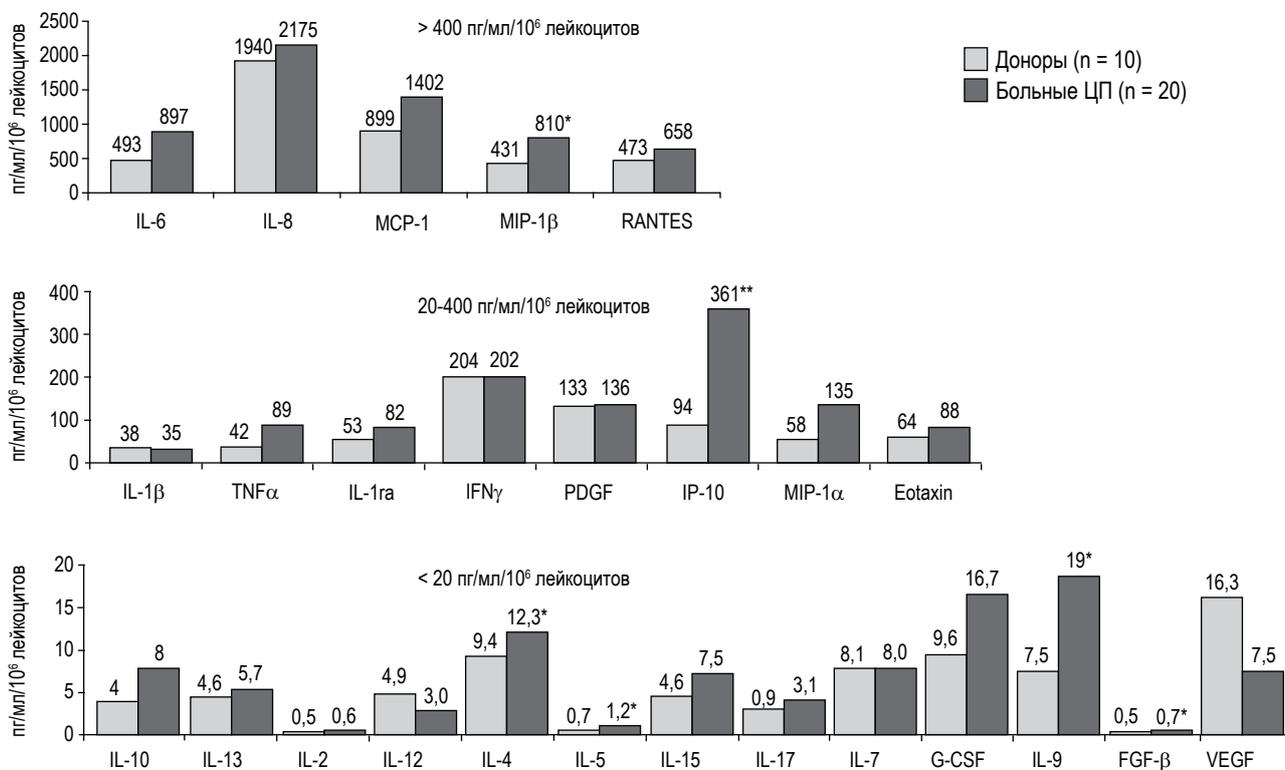


Рисунок 1. Спонтанная продукция 26 цитокинов, секретируемых клетками крови доноров и больных ЦП

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений. * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ТЯЖЕСТИ И ЭТИОЛОГИИ ЦП

Группы	Цитокины	Спонтанная продукция (пг/мл/10 ⁶ лейкоцитов)					
		Доноры (n = 10)	ЦП класс А (n = 13)	ЦП класс В+С (n = 7)	Невирусный ЦП (n = 8)	Вирусный ЦП (n = 12)	
Про- и противовоспалительные цитокины	IL-1 β	38 (8-59)	29 (19-64)	38 (6-81)	27 (18-41)	45 (20-82)	
	TNF α	42 (20-77)	90 (40-111)	83 (22-139)	61 (24-89)	103 (58-184)*	
	IL-1 γ	53 (24-88)	74 (44-129)	115 (46-213)	54 (36-106)	110 (50-173)*	
	IL-10	3,9 (3,4-8,1)	7,9 (4,8-11,4)	9,5 (3,9-14,4)	4,9 (3,5-8)	11,5 (5,1-14,7)*#	
	IL-2	0,5 (0,4-0,7)	0,6 (0,5-0,9)	0,7 (0,5-0,9)	0,6 (0,5-0,7)	0,7 (0,5-1,4)	
	IFN γ	204 (189-312)	187 (109-333)	296 (139-406)	212 (101-314)	201 (149-391)	
	IL-12	4,9 (2,2-6,8)	2,1 (1,4-5,0)	3,5 (2,3-9,9)	1,9 (1,3-4,4)*	3,6 (2,0-20)	
	IL-4	9,4 (7,7-10,8)	12 (9,8-14,8)	12,7 (10,4-15,8)	10 (7,9-14,9)	13 (10,6-16,2)	
	IL-5	0,7 (0,5-0,8)	0,9 (0,9-1,6)	1,2 (0,8-1,5)	1,1 (0,8-1,6)	1,2 (0,9-1,5)	
	IL-6	493 (103-939)	789 (505-1239)	1364 (136-1680)	758 (379-1165)	1091 (564-1734)	
Иммуно-регуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-9	7,5 (6,2-11)	15,3 (7,4-21)	42,5 (26,4-95,5)*#	12,4 (7,6-32)	26,5 (11,3-44)*	
	IL-13	4,6 (4-5,2)	5,7 (3,5-8)	5,7 (1,7-11,7)	3,9 (2,1-5,4)	7,0 (1,3-11,6)*#	
	IL-15	4,6 (2,5-7,6)	8,5 (5,5-11,2)	3,7 (1,9-12,4)	6,0 (4,2-11,8)	9,6 (3,6-11,4)	
	IL-17	0,9 (0,5-4,9)	3,1 (1,1-6,2)	5,6 (1,6-27,8)*	2,61 (1,0-3,7)	9,2 (2,1-23,4)*#	
	G-CSF	9,6 (7-31)	9,7 (8,3-19,8)	41,6 (3,8-66)	12,5 (9,1-26)	19,4 (6,5-54)	
	IL-7	8,1 (1,7-11,5)	8,4 (1,8-12,6)	2,7 (1,5-18,2)	7,7 (1,5-13,9)	8,0 (1,7-14,1)	
	FGF- β	0,5 (0,3-0,6)	0,7 (0,5-1,1)	0,9 (0,6-2,8)**	0,6 (0,3-0,8)	1,2 (0,6-2,8)**#	
Ростовые факторы	PDGF	133 (85-153)	98 (56-193)	183 (43-287)	140 (41-196)	136 (58-250)	
	VEGF	16,3 (1,6-36)	8,7 (2,7-15,9)	2,9 (2,4-74,6)	2,6 (1,3-8,3)	14 (3,5-63)#	
	IL-8	1940 (956-2193)	1842 (1307-2459)	3253 (1144-5046)*	1858 (1099-3065)	2324 (1413-4467)	
	IP-10	94 (49-178)	307 (259-1048)**	416 (188-911)**	283 (168-480)**	553 (259-1039)**	
	MCP-1	899 (527-1490)	1450 (1124-2312)	1294 (255-2028)	1455 (830-2116)	1402 (740-2619)	
СХС-и СС-хемокины	MIP-1 α	58 (24-131)	99 (84-192)	157 (20-294)	112 (76-151)	175 (53-324)	
	MIP-1 β	431 (190-507)	786 (400-1485)*	866 (398-2859)*	789 (348-846)*	1401 (580-2600)*	
	RANTES	473 (346-529)	533 (337-792)	799 (444-1076)*	504 (429-673)	782 (368-1123)*	
	Eotaxin	64 (48-77)	74 (63-131)	103 (83-160)*	74 (46-127)	95 (79-140)*	

Примечание. Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). * – $p_0 < 0,05$ и ** – $p_0 < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами; # – $p_0 < 0,05$ – достоверность различия ЦП класса В+С по сравнению с классом А и ЦП вирусной этиологии по сравнению с невирусным ЦП (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

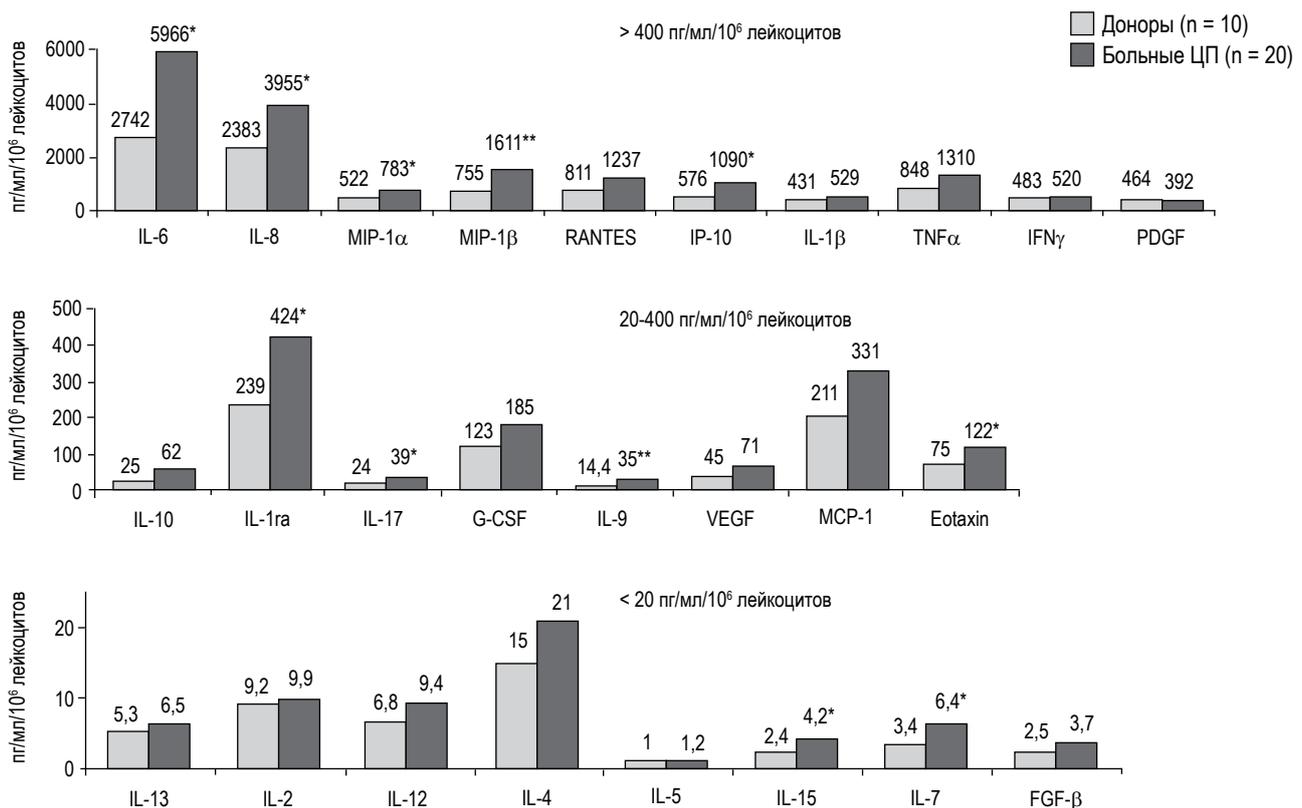


Рисунок 2. ЛПС-индуцированная продукция 26 цитокинов, секретируемых клетками крови доноров и больных ЦП

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений. * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Изменения профиля спонтанной продукции цитокинов были также более выражены в подгруппе пациентов ЦП вирусной этиологии. Помимо высокого уровня MIP-1 β и IP-10, у них регистрировался повышенный синтез клетками крови СС-хемокинов (RANTES, Eotaxin), про-(TNF α) и противовоспалительных (IL-1ra, IL-10, IL-13) цитокинов, IL-17, FGF- β и IL-9. По уровню IL-10, IL-13, IL-17 и FGF- β эти больные отличались не только от здоровых доноров, но и от больных ЦП невирусной этиологии.

Хорошо известно, что практически все гены цитокинов являются индуцибельными, поэтому наиболее ярко те или иные особенности продукции цитокинов могут быть выявлены в условиях активации клеток-продуцентов. Для того чтобы оценить функциональный резерв системы цитокинов и секреторный потенциал клеток-продуцентов в условиях митогенной стимуляции, мы использовали в качестве активатора бактериальный ЛПС (эндотоксин), поскольку данный митоген может индуцировать различные типы лейкоцитов (гранулоциты, лимфоциты, моноциты) через TLR-4. Из данных рисунка 2 видно,

что суточная инкубация клеток цельной крови с ЛПС приводит к увеличению количества цитокинов, хемокинов и ростовых факторов, которые секретируются на высоком (> 400 пг/мл/10⁶ лейкоцитов) или хорошо детектируемом уровне (от 20 до 400 пг/мл/10⁶ лейкоцитов). Тем не менее ЛПС-индуцированная продукция IL-2, IL-4, IL-5, IL-12, IL-13, IL-15, IL-7 и FGF- β оставалась низкой и не превышала 20 пг/мл/10⁶ лейкоцитов.

В целом по группе больных ЦП по сравнению с донорами в ответ на эндотоксин регистрировалось достоверное усиление синтеза IL-6, СХС (IL-8, IP-10) и СС-хемокинов (MIP-1 α , MIP-1 β , Eotaxin), IL-1ra, IL-17, IL-9, IL-7 и IL-15. При этом отмечалась тенденция к усилению продукции RANTES, MCP-1, TNF α , IL-10 и G-CSF.

Проведенные исследования показали (табл. 2), что клетки крови у больных ЦП сохраняют свою функциональную реактивность и, так же как клетки здоровых доноров, способны активно секретировать большинство (20/26) из анализируемых нами цитокинов в ответ на стимуляцию эндотоксином через TLR-4. Как в норме, так и при

ТАБЛИЦА 2. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РЕАКТИВНОСТЬ КЛЕТОК КРОВИ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЦП В ОТВЕТ НА СТИМУЛЯЦИЮ ЭНДОТОКСИНОМ

Группы	Цитокины	Продукция цитокинов (пг/мл/10 ⁶ лейкоцитов)					
		Доноры (n = 10)		Больные ЦП (n = 20)		ЛПС	ЛПС
		Спонтанная	ЛПС	Спонтанная	ЛПС		
Про- и противовоспалительные цитокины	IL-1 β	38 (8-59)	431 (285-500)**	35 (18-66)	529 (314-1066)**		
	TNF α	42 (20-77)	848 (748-1187)**	89 (30-125)	1310 (465-2157)**		
	IL-1 γ	53 (24-88)	239 (139-295)**	82 (45-130)	424 (210-748)**		
	IL-10	3,9 (3,4-8,1)	25 (13,7-58)**	8 (4-12)	62 (20-177)**		
	IL-2	0,5 (0,4-0,7)	9,2 (5,6-11,1)**	0,6 (0,5-0,9)	9,9 (1,3-17,4)**		
	IFN γ	204 (189-312)	483 (322-705)**	202 (136-361)	520 (345-769)**		
	IL-12	4,9 (2,2-6,8)	6,8 (4,6-11,2)*	3,0 (1,6-6,9)	9,4 (6-24)**		
	IL-4	9,4 (7,7-10,8)	15,2 (12,9-21,7)**	12,3 (10-15,4)	21,3 (16,4-29,5)**		
	IL-5	0,7 (0,5-0,8)	1,0 (0,7-2,8)	1,2 (0,9-1,5)	1,2 (0,8-1,8)		
	IL-6	493 (103-939)	2742 (1813-3478)**	897 (493-1489)	5966 (2834-9410)**		
	IL-9	7,5 (6,2-11)	14,4 (11,1-15,5)*	19 (7,6-44)	35 (22-50)*		
	IL-13	4,6 (4-5,2)	5,3 (3,9-7,7)	5,7 (2,5-8)	6,5 (3,8-9,4)		
Ростовые факторы	IL-15	4,6 (2,5-7,6)	2,4 (0,9-3,1)	7,5 (4-11,4)	4,2 (2,1-6,7)		
	IL-17	0,9 (0,5-4,9)	24 (16,6-31,3)**	3,1 (1,5-13,6)	39 (21-52)**		
	G-CSF	9,6 (7-31)	123 (48-145)**	16,7 (7-37)	185 (83-311)**		
	IL-7	8,1 (1,7-11,5)	3,4 (1,5-5,0)	8,0 (1,7-14,1)	6,4 (2,7-13)		
	FGF- β	0,5 (0,3-0,6)	2,5 (1,5-3,5)**	0,7 (0,5-1,7)	3,7 (1,6-5,2)**		
	PDGF	133 (85-153)	464 (309-587)**	136 (55-210)	392 (118-582)*		
	VEGF	16,3 (1,6-36)	45,5 (36,5-57,5)*	7,5 (2,6-27)	71 (41-88)**		
	IL-8	1940 (956-2193)	2383 (1922-3416)*	2175 (1276-3653)	3955 (2846-5854)*		
	IP-10	94 (49-178)	576 (292-743)**	361 (245-970)	1090 (664-1697)*		
	MCP-1	899 (527-1490)	211 (148-370)*	1402 (830-2258)	331 (221-736)**		
	MIP-1 α	58 (24-131)	552 (454-674)**	135 (73-276)	783 (547-1017)**		
	MIP-1 β	431 (190-507)	755 (497-944)**	810 (400-1840)	1611 (1133-2974)*		
RANTES	473 (346-529)	811 (736-927)**	658 (430-1046)	1237 (544-1792)*			
Eotaxin	64 (48-77)	75 (60-92)	88 (69-140)	122 (78-144)			

Примечание. Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ – UQ). * – $p_0 < 0,05$ и ** – $p_0 < 0,01$ – достоверность различия показателей в группах по сравнению со спонтанной продукцией (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 3. ЛПС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ, РАЗЛИЧАЮЩИХСЯ ПО ТЯЖЕСТИ И ЭТИОЛОГИИ ЦП

Группы	Цитокины	ЛПС-индуцированная продукция (пг/мл/10 ⁶ лейкоцитов)					
		Доноры (n = 10)	ЦП класс А (n = 13)	ЦП класс В+С (n = 7)	Невирусный ЦП (n = 8)	Вирусный ЦП (n = 12)	
Про- и противовоспалительные цитокины	IL-1 β	431 (285-500)	496 (366-1116)	589 (263-1017)	282 (125-816)	574 (415-1289)*	
	TNF α	848 (748-1187)	1517 (1063-2187)	806 (250-2007)	671 (304-1433)	2067 (1063-3698)*.#	
	IL-1ra	239 (139-295)	571 (261-776)*	347 (159-551)	266 (101-519)	561 (277-794)**	
	IL-10	25 (13,7-58)	79 (31-191)*	36,6 (19,4-118)	34 (10-135)	81 (34-179)*	
	IL-2	9,2 (5,6-11,1)	11,5 (5,8-19,8)	8,7 (1,2-13,5)	6,1 (0,7-12)	11 (6,8-20)	
	IFN γ	483 (322-705)	464 (334-865)	589 (356-672)	387 (233-526)	645 (441-1302)*	
	IL-12	6,8 (4,6-11,2)	12,6 (6,8-23,9)*	7,2 (2,6-37)	6,9 (4,1-14)	12 (7-48)	
	IL-4	15,2 (12,9-21,7)	18 (16,4-27,6)	27 (19,4-32,4)*	18,6 (9,6-29)	24 (17-30)*	
	IL-5	1,0 (0,7-2,8)	1,0 (0,8-1,7)	1,2 (1,0-1,9)	1,3 (0,7-1,7)	1,1 (0,9-2,0)	
	IL-6	2742 (1813-3478)	5849 (3428-7596)*	6083 (2239-9900)*	3288 (1775-7916)	6432 (3972-10600)**	
Иммуно-регуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-9	14,4 (11,1-15,5)	25,8 (20-36,6)**	43,4 (36,4-88)**.#	23 (16-37)*	40 (30-71)**.#	
	IL-13	5,3 (3,9-7,7)	7,2 (5,5-8,8)	4,7 (1,4-18,2)	5,3 (2,9-6,5)	7,5 (4,5-14)	
	IL-15	2,4 (0,9-3,1)	3,8 (3,0-6,2)*	5,2 (1,8-6,8)	3,5 (2,5-4,9)*	5,5 (2,1-7)*	
	IL-17	24 (16,6-31,3)	33 (20,6-50)	42 (34-54)*	27 (7,6-41,6)	43 (33-54)**	
	G-CSF	123 (48-145)	155 (79-351)	191 (87-251)	138 (41-241)	187 (130-431)*	
	IL-7	3,4 (1,5-5,0)	6,7 (3,4-12,6)*	4,4 (1,4-14,2)	6,4 (3,4-11,5)	6,5 (2,3-13)	
	FGF- β	2,5 (1,5-3,5)	4,1 (2,0-5,0)	3,2 (0,9-6,7)	1,5 (0,6-3,3)	5,0 (3,1-7)**.##	
	PDGF	464 (309-587)	351 (103-584)	447 (132-547)	187 (63-529)	440 (202-598)	
	VEGF	45,5 (36,5-57,5)	54,2 (44,3-78,7)	71 (37,7-97)	34 (13-62)	77 (63-113)*.#	
	IL-8	2383 (1922-3416)	3575 (2844-5851)	4117 (3247-14952)*	2960 (1855-4012)	5110 (3683-11633)**.#	
Ростовые факторы	IP-10	576 (292-743)	972 (703-1846)*	1176 (626-1549)*	756 (187-1298)	1521 (918-2391)**.#	
	MCP-1	211 (148-370)	293 (234-618)	354 (208-875)	323 (231-736)	331 (220-681)	
	MIP-1 α	552 (454-674)	734 (427-950)	870 (575-1029)*	473 (333-930)	859 (731-1061)**.#	
	MIP-1 β	755 (497-944)	1252 (1063-2188)*	3026 (1252-4863)**.#	1153 (843-1512)	2517 (1376-4024)**.#	
	RANTES	811 (736-927)	883 (569-1511)	1666 (518-1970)	872 (376-1327)	1544 (599-1944)	
	Eotaxin	75 (60-92)	112 (74-134)	135 (85-205)*	101 (57-132)	130 (83-174)*	
	СХС-и СС-хемокины						

Примечание. Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). * – $p_0 < 0,05$ и ** – $p_0 < 0,01$ – достоверность различия показателей больных ЦП по сравнению с донорами; # – $p_0 < 0,05$ – достоверность различия ЦП класса В+С по сравнению с классом А и ЦП вирусной этиологии по сравнению с невирусным ЦП (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 4. ДИСПЕРСИОННЫЙ ОДНОФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО СТАТУСА ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ ЦП

Цитокины	Доноры (n = 10) vs ЦП класс А (n = 13) vs ЦП класс В+С (n = 7)		Доноры (n = 10) vs невирусный ЦП (n = 8) vs вирусный ЦП (n = 12)	
	Спонтанная продукция	ЛПС- индуцированная	Спонтанная продукция	ЛПС- индуцированная
	Н-критерий	Н-критерий	Н-критерий	Н-критерий
IL-1ra	2,38	3,35	4,24	6,81*
IL-10	1,73	2,44	4,66	7,89*
IL-4	4,31	4,0	6,26*	4,1
IL-17	4,28	4,95	6,4*	7,66*
IL-9	7,26*	15,29**	5,22	15,30**
FGF-β	8,31*	1,76	10,43**	11,42*
VEGF	0,36	1,59	4,57	8,35*
IL-8	2,23	4,99	1,92	10,45**
IP-10	13,8**	5,46	15,42**	10,67**
MIP-1α	2,82	4,39	3,0	8,40*
MIP-1β	6,34*	11,45**	6,7*	13,51**
Eotaxin	5,56	6,07*	5,28	5,97*

Примечание. Дисперсионный однофакторный анализ проводили с использованием непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса. * – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$ – значимость Н-критерия Краскела–Уоллиса.

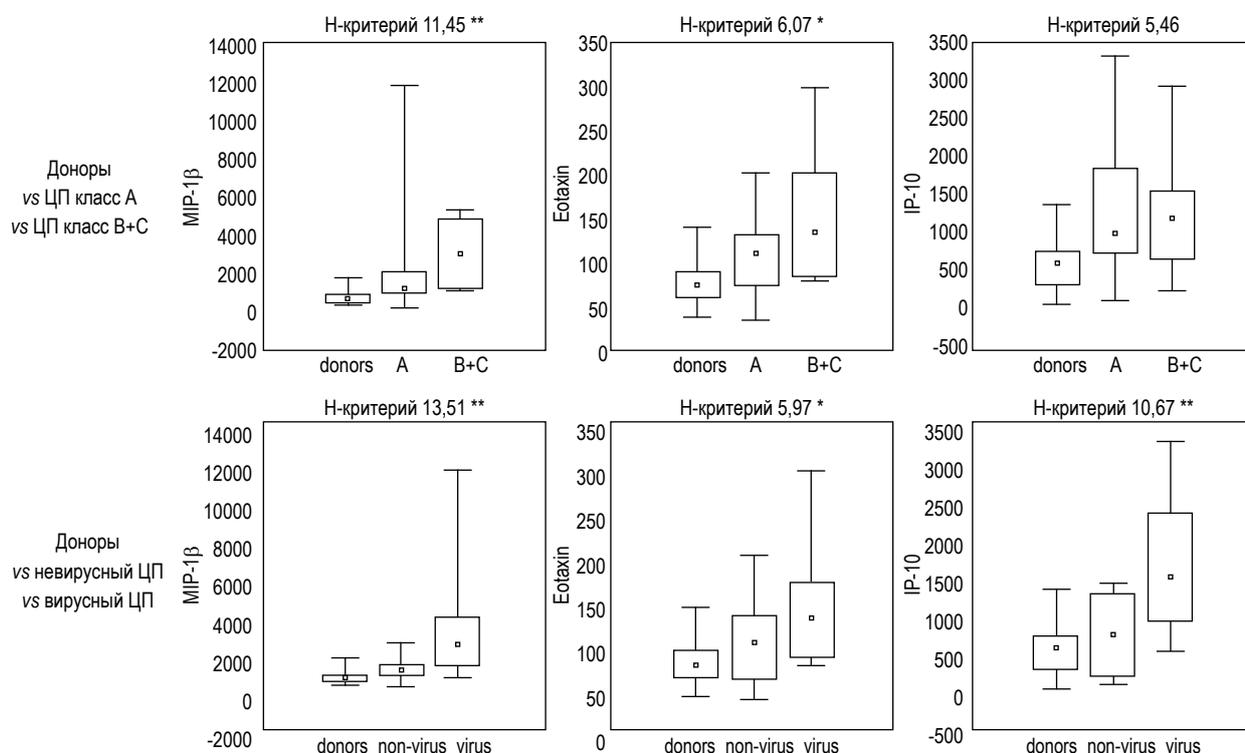


Рисунок 3. Межгрупповые различия доноров и больных ЦП по уровню ЛПС-индуцированной продукции хемокинов (MIP-1β, Eotaxin, IP-10)

Примечание. Данные получены при проведении дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и представлены в виде медиан, интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений.

* – $p < 0,05$ и ** – $p < 0,01$ – значимость Н-критерия Краскела–Уоллиса.

ЦП, в условиях митогенной стимуляции значительно не изменялась продукция только 5 цитокинов (IL-13, IL-5, IL-15, IL-7, Eotaxin), а интенсивность синтеза MCP-1 снижалась.

Из данных таблицы 3 видно, что повышенная ЛПС-индуцированная продукция IL-6, IL-9, IP-10, MIP-1 β обнаруживалась у больных ЦП независимо от степени тяжести заболевания. Тем не менее, по сравнению с донорами в подгруппе больных ЦП класса А, дополнительно регистрировалось статистически значимое увеличение уровня противовоспалительных цитокинов IL-1ra и IL-10 (очевидно, в ответ на высокий уровень продукции TNF α – 1517 vs 848 пг/мл/10⁶ лейкоцитов у доноров, $p > 0,05$). Достоверные различия были выявлены и в отношении IL-12, IL-15 и IL-7, хотя, в абсолютных цифрах эти изменения не были столь яркими. Цитокиновый профиль у больных ЦП класса В+С отличался от здоровых доноров прежде всего высоким уровнем ЛПС-индуцированного синтеза хемокинов – не только IP-10 и MIP-1 β , но и IL-8, MIP-1 α и Eotaxin, а также IL-4. При этом интенсивность секреции IL-9 и MIP-1 β была достоверно выше, чем у больных ЦП класса А.

Наименьшие изменения в характере ЛПС-индуцированной продукции цитокинов регистрировались у больных ЦП невирусной этиологии. По сравнению с донорами в данной подгруппе отмечалось лишь незначительное, хотя и статистически достоверное повышение уровня IL-15 и IL-9. В то же время у больных вирусным HCV-гепатитом с исходом в ЦП реактивность клеток крови в ответ на стимуляцию эндотоксином была максимально выраженной. По своим проявлениям регистрируемая в этом случае картина напоминала «цитокиновый шторм» *in vitro*. Клетки больных активно продуцировали про- (IL-1 β , TNF α) и противовоспалительные (IL-1ra, IL-10) цитокины, Th1- (IFN γ) и Th2-цитокины (IL-4), IL-6 и IL-17, ростовые факторы (G-CSF, IL-9, FGF- β , VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MIP-1 β , MIP-1 α , Eotaxin). По уровню ЛПС-индуцированной секреции TNF α , IFN γ , IL-9, FGF- β , VEGF, IL-8, IP-10, MIP-1 β , MIP-1 α больные ЦП вирусной этиологии отличались не только от здоровых доноров, но и от больных ЦП невирусной природы.

Не удивительно, что наибольшее количество (11/12) цитокинов, позволяющих эффективно дискриминировать группы здоровых доноров и больных ЦП с различной этиологией заболевания, обнаруживается в культурах клеток крови, активированных эндотоксином (табл. 4). В отсутствие стимуляции Н-критерий Краскела–Уоллиса был статистически значимым только в от-

ношении 5 медиаторов (IP-10, FGF- β , MIP-1 β , IL-17 и IL-4). Следует отметить, что значения Н-критерия IP-10, FGF- β , MIP-1 β , IL-9, IL-8 в спонтанных и/или ЛПС-стимулированных культурах клеток крови были сопоставимы со значениями критерия Краскела–Уоллиса таких общепринятых маркеров фиброгенеза, как альбумин (Н-критерий 15,8; $p < 0,01$), общий билирубин (14,02; $p < 0,01$), АЛТ (10,46; $p < 0,01$), АСТ (11,15; $p < 0,01$), ГГТП (9,21; $p < 0,01$), фибриноген (8,42; $p < 0,05$), тимоловая проба (8,0; $p < 0,05$).

Группы здоровых доноров и больных ЦП с различной тяжестью заболевания (класс А и класс В+С по Child-Pugh) различались по уровню спонтанной продукции IP-10, FGF- β , IL-9, MIP-1 β , а также ЛПС-индуцированной секреции IL-9, MIP-1 β и Eotaxin. В качестве примера на рисунке 3 представлены диаграммы по отдельным хемокинам, секретлируемым клетками крови в ответ на стимуляцию эндотоксином, которые позволяют с различной эффективностью различать ЦП как по степени тяжести, так и этиологии заболевания (MIP-1 β > Eotaxin), а также специфичны только в отношении этиологии ЦП (IP-10).

Обсуждение

Цитокины играют важную роль в патогенезе ЦП, детерминируя тяжесть заболевания, развитие печеночных и внепеченочных осложнений [14, 25, 33]. Учитывая плеiotропность цитокинов, оценка их патогенетической значимости должна основываться на исследовании широкого спектра цитокинов. Использование мультиплексного протеомного анализа позволяет решить эту задачу и более полно охарактеризовать профиль цитокинов, продуцируемых клетками крови больных ЦП. Клетки периферической крови, включающие нейтрофилы, моноциты и лимфоциты, являются важными медиаторами врожденного и приобретенного иммунитета, однако их роль в поддержании хронического воспаления при ЦП исследована недостаточно. Поэтому при анализе мы использовали оценку 4 функциональных групп цитокинов, вовлеченных в патогенез воспалительного процесса – про-/противовоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF α , IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES, Eotaxin).

Проведенное исследование показало, что клетки крови больных ЦП являются активными продуцентами цитокинов и характеризуются

ся повышенной секрецией цитокинов из всех 4 функциональных групп. Усиление продукции многих цитокинов ассоциировано с тяжестью ЦП и вирусной этиологией ЦП. При этом возрастание как спонтанной, так и ЛПС-стимулированной секреции цитокинов свидетельствует о сохранной реактивности клеток крови к эндотоксину.

В целом по группе достоверное возрастание (из числа цитокинов, концентрация которых превышала 2 пг/мл/10⁶ лейкоцитов) регистрировалось в нестимулированных культурах крови для 4 цитокинов (IL-4, IL-9, MIP-1 β , IP-10) и в ЛПС-стимулированных культурах – для 11 цитокинов (IL-1 α , IL-6, IL-7, IL-15, IL-17, IL-9, IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , Eotaxin). Большинство исследований, сконцентрированных на изучении уровня цитокинов в сыворотке крови, демонстрируют, что пациенты с ЦП характеризуются повышенным уровнем провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-17), а также хемокинов (IL-8, IP-10) [6, 14]. Кроме того, данные о повышенной продукции хемокинов моноцитами у пациентов с ЦП суммированы в обзоре Kochlios [19]. В этом аспекте наши результаты согласуются с данными литературы и позволяют предположить, что клетки крови вносят существенный вклад в изменение сывороточного уровня цитокинов. Кроме того, нами выявлено возрастание ряда иммунорегуляторных и ростовых факторов (IL-7, IL-15, IL-9), которые у больных ЦП ранее не исследовались. IL-15 и IL-7 относятся к цитокинам, поддерживающим гомеостатическую пролиферацию [5] и их возрастание, возможно, связано с лейко- и лимфопенией, являющейся характерным проявлением синдрома гиперспленизма у больных ЦП. IL-9 секретируется Th9-клетками и может участвовать в поддержании воспалительного процесса при аутоиммунных и аллергических заболеваниях [17]. Роль этого цитокина при ЦП не оценивалась, однако последние данные показали значимое увеличение IL-9 в сыворотке крови больных вирусным гепатитом В и прямую корреляцию между концентрацией этого цитокина с уровнем АЛТ, являющегося биохимическим индикатором воспаления при вирусных гепатитах [21].

Сравнение цитокинового профиля у больных с компенсированным (класс А) и декомпенсированным (класс В+С) циррозом показало, что если у пациентов с классом А повышенная спонтанная и стимулированная продукция отмечалась, соответственно, для 2 и 8 цитокинов, то у больных с декомпенсированным ЦП – соответственно, для 7 и 10 цитокинов. Таким образом, утяжеление ЦП проявлялось расширени-

ем спектра цитокинов с повышенным уровнем спонтанной продукции за счет хемокинов (IL-8, RANTES, Eotaxin) и иммунорегуляторных цитокинов (IL-9, IL-17). Относительно ЛПС-стимулированной продукции цитокинов, нарастание тяжести ассоциировалось не только с увеличением количества цитокинов с повышенным уровнем продукции, но и с изменением их профиля. Так, несмотря на ряд общих признаков для пациентов с классом А и В+С в виде повышенной секреции IL-6, IL-9 и хемокинов (IP-10 и MIP-1 β), характерным для класса А было усиление стимулированной продукции IL-1 α , IL-10 и IL-12, а для пациентов с классом В+С – возрастание иммунорегуляторных цитокинов IL-4, IL-15, IL-17 и хемокинов IL-8, MIP-1 α , Eotaxin, а также и более высокая (чем в классе А) продукция IL-9 и MIP-1 β . Это позволяет предположить, что на начальных стадиях ЦП клетки крови обладают компенсаторным противовоспалительным потенциалом, который истощается по мере прогрессии ЦП и что декомпенсация ЦП ассоциирована с нарастанием провоспалительной активности клеток крови.

Сопряженность тяжести ЦП с уровнем сывороточных цитокинов (TNF α , IL-8 и IL-6) описана при ЦП как вирусной, так и алкогольной этиологии [10, 14]. В этом плане наши данные являются еще одним аргументом, подтверждающим наличие прямой взаимосвязи между уровнем провоспалительных медиаторов и тяжестью ЦП. Рядом авторов также показана повышенная продукция провоспалительных цитокинов и хемокинов (TNF α , IL-6, MCP-1) моноцитами периферической крови больных ЦП [30]. В то же время нами впервые показано, что профиль цитокинов, продуцируемых в повышенных концентрациях клетками крови, у больных с компенсированным и декомпенсированным ЦП различается. В частности, утяжеление ЦП ассоциировано с усилением продукции клетками крови Th17-, Th9-, Th2-цитокинов и хемокинов (IL-17, IL-9, IL-15, MIP-1 β , Eotaxin).

Сравнение цитокинового профиля в зависимости от этиологии ЦП показало, что пациенты с циррозом невирусной этиологии отличались от пациентов с вирусным ЦП значительно меньшим числом цитокинов с повышенным уровнем продукции. Так, усиление спонтанной продукции в этой группе регистрировалось для 2 цитокинов, а стимулированной продукции только для 1 цитокина, тогда как при вирусных ЦП повышенный уровень спонтанной и стимулированной продукции выявлялся, соответственно, для 10 и 17 цитокинов. В литературе нам не встретилось исследований по сравнительной характеристике

цитокинового профиля у пациентов с ЦП различных этиологий. Однако, если при вирусных гепатитах повышенный уровень провоспалительных цитокинов и хемокинов в сыворотке крови отмечается большинством авторов [2, 6, 9], то данные при алкогольных ЦП менее однозначны. Действительно, некоторые авторы не выявили возрастания сывороточного TNF α , IL-6 и IL-8 при алкогольном ЦП [28] либо отметили возрастание TNF α и IL-8 только при декомпенсированных формах ЦП [10]. Относительно продукции провоспалительных цитокинов показано, что при алкогольных гепатитах секреция TNF α моноцитами крови действительно повышена [23]. В то же время при ЦП моноциты характеризуются сниженной секрецией IL-1 и TNF α [24]. Сходные данные о низкой спонтанной продукции моноцитами IL-1, IL-6, IL-12 и TNF α у пациентов с алкогольным ЦП были получены Laso F.J. с соавт [20]. Поскольку продукция цитокинов клетками крови во многом опосредуется моноцитами, эти данные согласуются с полученными нами результатами. Полученные нами факты позволяют предположить, что при ЦП невирусной этиологии клетки крови в меньшей степени вовлечены в поддержание воспалительного процесса, чем при вирусных ЦП.

Повышенный уровень провоспалительных цитокинов в сыворотке крови больных ЦП, и прежде всего TNF α , связывают с эндотоксемией в результате транслокации бактериальной флоры [4]. Однако, согласно данным литературы, концентрация эндотоксина не коррелирует с уровнем цитокинов. Более того, моноциты периферической крови отвечают продукцией цитокинов на повторную стимуляцию ЛПС [11, 27]. Эти результаты согласуются с полученными нами данными о сохранной реактивности клеток крови на стимуляцию эндотоксином. Отсутствие ЛПС-анергии может быть обусловлено преактивацией отвечающих клеток другими бактериальными антигенами (например, грамм-позитивной флоры) через TLR-2 рецепторы, экспрессия которых повышена при ЦП [27]. Другим объяснением может быть потеря толерантности моноцитами крови в результате повышенной экспрессии TLRs [12].

В целом полученные нами данные свидетельствуют о важном вкладе циркулирующих клеток крови в поддержание воспалительного ответа при ЦП и потенциальной диагностической/прогностической значимости цитокинов, продуцируемых клетками крови.

Список литературы / References

1. Останин А.А., Черных Е.Р. Сравнительная оценка уровня 17 цитокинов в сыворотке и цельной крови здоровых доноров методом проточной флюориметрии // Цитокины и воспаление, 2005. Т. 4, № 2. С. 25-32. [Ostanin A.A., Chernykh E.R. The comparative analysis of 17 cytokines level in serum and whole blood of healthy donors using the Bio-Plex protein array system. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2005, Vol. 4, no. 2, pp. 25-32. (In Russ.)]
2. Abd EL-Ghaffar N., Rasheed W.I., Ramzy T., El Batae H. Prognostic significance of interleukins determination in liver diseases. *Res. J. Medicine and Med. Sci.*, 2008, Vol. 3, no. 2, pp. 124-131.
3. Akriviadis E., Botla R., Briggs W., Han S., Reynolds T., Shakil O. Pentoxifylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterol.*, 2000, Vol. 119, no. 6, pp. 1637-1648.
4. Bellot P., Francés R., Such J. Pathological bacterial translocation in cirrhosis: pathophysiology, diagnosis and clinical implications. *Liver Int.*, 2013, Vol. 33, no. 1, pp. 31-39.
5. Boyman O., Létourneau S., Krieg C., Sprent J. Homeostatic proliferation and survival of naïve and memory T cells. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 8, pp. 2088-2094.
6. Capone F., Guerriero E., Colonna G., Maio P., Mangia A., Castello G., Costantini S. Cytokine profile evaluation in patients with hepatitis C virus infection. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 28, pp. 9261-9269.
7. Carson R., Vignali D. Simultaneous quantitation of fifteen cytokines using a multiplexed flow cytometric assay. *J. Immunol. Methods.*, 1999, Vol. 227, no. 1-2, pp. 41-52.
8. Cervoni J.P., Thévenot T., Weil D., Muel E., Barbot O., Sheppard F., Monnet E., Di Martino V. C-reactive protein predicts short-term mortality in patients with cirrhosis. *J. Hepatol.*, 2012, Vol. 56, no. 6, pp. 1299-1304.
9. Costantini S., Capone F., Guerriero E., Maio P., Colonna G., Castello G. Serum cytokine levels as putative prognostic markers in the progression of chronic HCV hepatitis to cirrhosis. *Eur. Cytokine Netw.*, 2010, Vol. 21, no. 4, pp. 251-256.
10. Daniluk J., Szuster-Ciesielska A., Drabko J., Kandfer-Szerszeń M. Serum cytokine levels in alcohol-related liver cirrhosis. *Alcohol.*, 2001, Vol. 23, no. 1, pp. 29-34.

11. Devière J., Content J., Denys C., Vandenbussche P., Schandene L., Wybran J., Dupont E. Excessive *in vitro* bacterial lipopolysaccharide-induced production of monokines in cirrhosis. *Hepatology*, 1990, Vol. 11, no. 4, pp. 628-634.
12. Dolganiuc A., Norkina O., Kodys K., Catalano D., Bakis G., Marshall C., Mandrekar P., Szabo G. Viral and host factors induce macrophage activation and loss of toll-like receptor tolerance in chronic HCV infection. *Gastroenterology*, 2007, Vol. 133, no. 5, pp. 1627-1636.
13. Fujimoto M., Uemura M., Nakatani Y., Tsujita S., Hoppo K., Tamagawa T., Kitano H., Kikukawa M., Ann T., Ishii Y., Kojima H., Sakurai S., Tanaka R., Namisaki T., Noguchi R., Higashino T., Kikuchi E., Nishimura K., Takaya A., Fukui H. Plasma endotoxin and serum cytokine levels in patients with alcoholic hepatitis: relation to severity of liver disturbance. *Alcoholism*, 2000, Vol. 24, no. 4, pp. S48-S54.
14. Goral V., Atayan Y., Kaplan A. The relation between pathogenesis of liver cirrhosis, hepatic encephalopathy and serum cytokine levels: what is the role of tumor necrosis factor α ? *Hepatogastroenterology*, 2011, Vol. 58, no. 107-108, pp. 943-948.
15. Guarner C., Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2005, Vol. 17, no. 1, pp. 27-31.
16. Kamijo A., Yoshizawa K., Joshita S., Yoneda S., Umemura T., Ichijo T., Matsumoto A., Ota M., Tanaka E. Cytokine profiles affecting the pathogenesis of autoimmune hepatitis in Japanese patients. *Hepatol. Res.*, 2011, Vol. 41, no. 4, pp. 350-357.
17. Kaplan M.H. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunol. Rev.*, 2013, Vol. 252, no. 1, pp. 104-115.
18. Kawaratani H., Tsujimoto T., Douhara A., Takaya H., Moriya K., Namisaki T., Noguchi R., Yoshiji H., Fujimoto M., Fukui H. The effect of inflammatory cytokines in alcoholic liver disease. *Mediators Inflamm.*, 2013, Vol. 2013, p. 495156.
19. Kochlios E., Foka P., Mavromara P. Modulation of monocyte/macrophage-derived cytokine and chemokine expression profile by persistent Hepatitis C virus (HCV) infection leads to chronic inflammation. *J. Mol. Biochem.*, 2012, Vol. 1, no. 1, pp. 40-53
20. Laso F.J., Vaquero J.M., Almeida J., Marcos M., Orfao A. Production of inflammatory cytokines by peripheral blood monocytes in chronic alcoholism: relationship with ethanol intake and liver disease. *Cytometry part B: Clin Cytom.*, 2007, Vol. 72, no. 5, pp. 408-415
21. Li S., Hong-sheng L., Ling-juan R., Zhen-huan R., Xiao-nan K. Expression and clinical significance of T helper 9 cells and interleukin-9 in chronic hepatitis B patients. *Disease Surveillance*, 2015, Vol. 30, no. 1, pp. 35-37.
22. Maher M., Yossef T., Darwesh H., Saady A.E., Sabry A.I., Ahamed W., Safwat A. Estimation role of interleukin 6 as a predictor of hepatic encephalopathy in critically ill cirrhotic patients. *Life Sci. J.*, 2013, Vol. 10, no. 12s, pp. 987-991.
23. McClain C.J., Song Z., Barve S., Hill D.B., Deaciuc I. Recent advances in alcoholic liver disease. IV. Dysregulated cytokine metabolism in alcoholic liver disease. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2004, Vol. 287, no. 3, pp. G497-G502.
24. Muzes G., Deak G., Lang I., Gonzalez-Cabello R., Gergely P., Feher J. Depressed monocyte production of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Liver*, 1989, Vol. 9, no. 5, pp. 302-306.
25. Neuman M.G. Cytokines – central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Research Health.*, 2003, Vol. 27, no. 4, pp. 307-316.
26. Nieto J.C., Sánchez E., Román E., Vidal S., Oliva L., Guarner-Argente C., Poca M., Torras X., Juárez C., Guarner C., Soriano G. Cytokine production in patients with cirrhosis and TLR4 polymorphisms. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 46, pp. 17516-17524.
27. Riordan S.M., Skinner N., Nagree A., McCallum H., McIver C.J., Kurtovic J., Hamilton J.A., Bengmark S., Williams R., Visvanathan K. Peripheral blood mononuclear cell expression of toll-like receptors and relation to cytokine levels in cirrhosis. *Hepatology*, 2003, Vol. 37, no. 5, pp. 1154-1164.
28. Szuster-Ciesielska A., Daniluk J., Kandefer-Zerszeń M. Serum levels of cytokines in alcoholic liver cirrhosis and pancreatitis. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2000, Vol. 48, no. 4, pp. 301-307.
29. Tang J.T., Fang J.Y., Gu W.Q., Li E.L. T cell immune response is correlated with fibrosis and inflammatory activity in hepatitis B cirrhotics. *World J. Gastroenterol.*, 2006, Vol. 12, no. 19, pp. 3015-3019.
30. Tazi K.A., Quioc J.J., Abdel-Razek W., Tellier Z., Guichard C., Ogier-Denis E., Lebrec D., Moreau R. Protein array technology to investigate cytokine production by monocytes from patients with advanced alcoholic cirrhosis: an *ex vivo* pilot study. *Hepatol. Res.*, 2009, Vol. 39, pp. 706-715.
31. Tilg H., Jalan R., Kaser A., Davies N.A., Offner F.A., Hodges S.J., Ludwiczek O., Shawcross D., Zoller H., Alisa A., Mookerjee R.P., Graziadei I., Datz C., Trauner M., Schuppan D., Obrist P., Vogel W., Williams R. Anti-tumor necrosis factor- α monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.*, 2003, Vol. 38, no. 4, pp. 419-425.

32. Yagoob P., Newsholme E.A., Calder P.C. Comparison of cytokine production in cultures of whole human blood and purified mononuclear cells. *Cytokine*, 1999, Vol. 11, no. 8, pp. 600-605.

33. Zampino R., Marrone A., Restivo L., Guerrera B., Sellitto A., Rinaldi L., Romano C., Adinolfi L.E. Chronic HCV infection and inflammation: clinical impact on hepatic and extra-hepatic manifestations. *World J. Hepatol.*, 2013, Vol. 5, no. 10, pp. 528-540.

Авторы:

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии НИИ фундаментальной и клинической иммунологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Старостина Н.М. — к.м.н., заслуженный врач РФ, заведующая отделением иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Меледина И.В. — к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Шипунов М.В. — к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Леплина О.Ю. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Шевела Е.Я. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Черных Е.Р. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, заведующая лабораторией клеточной иммунотерапии, Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Ostanin A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Starostina N.M., PhD (Medicine), Honored Doctor of the Russian Federation, Head, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Meledina I.V., PhD (Medicine), Doctor-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shipunov M.V., PhD (Medicine), Doctor-Immunologist, Immunology Department, Clinic of Immunopathology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Leplina O. Yu., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Shevela E. Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Chernykh E.R., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 01.07.2015
Принята к печати 30.08.2015

Received 01.07.2015
Accepted 30.08.2015

КЛИНИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ АДЕМЕТИОНИНА У БОЛЬНЫХ ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННЫМ ОСТЕОАРТРИТОМ: ПЕРЕКРЕСТНОЕ ПИЛОТНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

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

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

² ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

³ Городской диабетологический центр, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Остеоартрит (ОА) является наиболее распространенным ревматическим заболеванием, в настоящее время эффективная терапия ОА не разработана. Предполагается, что неудачи в лечении остеоартрита (ОА) обусловлены гетерогенностью заболевания, проявляющейся в формировании различных субтипов (фенотипов) ОА. Одним из предложенных фенотипов ОА является диабет-ассоциированный ОА. Ключевым механизмом, лежащим в основе воспалительных и дегенеративных изменений при ОА, является уменьшение метилирования ДНК в ряде клеток, которое также было продемонстрировано и при сахарном диабете 2 типа. Таким образом, фармакологическое повышение метилирования ДНК может быть эффективной стратегией лечения, оказывающего плеiotропные эффекты при диабет-ассоциированном ОА. В рандомизированном перекрестном исследовании оценивалась эффективность и безопасность применения донора метильной группы адеметионина в сравнении с хондроитина сульфатом у больных с ОА, ассоциированным с сахарным диабетом 2 типа. Пациенты случайно распределялись к последовательному приему хондроитина сульфата/адеметионина или адеметионина/хондроитина сульфата в течение 1 месяца, период отмывки составил 2 недели. Первичной конечной точкой был уровень боли по визуальной аналоговой шкале (ВАШ). Боль, функция и симптомы со стороны коленных, тазобедренных суставов и суставов кистей также оценивались по шкалам KOOS, WOMAC, FHOA. Показатели общего состояния здоровья оценивались по шкале SF-36. Для оценки системного воспаления определяли содержание IL-6, IL-18 и СРБ в сыворотке ПК, с ИФА. Содержание биомаркеров деструкции хряща (агрекана и антител к коллагену II типа) в сыворотке ПК оценивали методом ИФА. Уровень липидов в сыворотке ПК определяли стандартным методом, содержание гликированного гемоглобина – с использованием жидкостной хроматографии. В исследование было включено 10 пациентов (женщины 61,7-74,2 лет,

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

И.В. Ширинский, О.В. Сазонова, Н.Ю. Калиновская,
В.С. Ширинский, «Клиническая эффективность
и безопасность применения адеметионина у больных
диабет-ассоциированным остеоартритом: перекрестное
пилотное исследование» // Медицинская иммунология,
2015. Т. 17, № 6. С. 553-560.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-553-560

For citation:

I.V. Shirinsky, O.V. Sazonova, N.Yu. Kalinovskaya, V.S. Shirinsky,
“Clinical efficacy and safety of ademetionine in patients with
diabetes-associated osteoarthritis: a cross-over pilot study”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17,
no. 6, pp. 553-560. doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-553-560

ИМТ – 1,1–38,4 кг/м²). Установлено, что прием адеметионина оказывает статистически значимый анальгетический эффект (снижение уровня боли по ВАШ), улучшает функцию коленных суставов и уменьшает выраженность симптомов в коленных (по субшкалам KOOS), не влияет на биомаркеры системного воспаления, деструкции хрящевой ткани. Не изменилось также содержание липидов и гликированного гемоглобина. Адеметионин хорошо переносился, серьезных нежелательных явлений за время терапии не зарегистрировано. Заключается, что адеметионин не обладает плеiotропным фармакологическим действием при диабет-ассоциированном ОА и возможность его использования при коморбидной патологии требует дальнейшего изучения.

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

CLINICAL EFFICACY AND SAFETY OF ADEMETIONINE IN PATIENTS WITH DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS: A CROSS-OVER PILOT STUDY

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

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

^b Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^c Novosibirsk City Diabetic Center, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Osteoarthritis (OA) is one of most common rheumatic diseases, and currently there is no effective pharmacological treatment of OA. It has been suggested that lack of effective treatment is, in part, due to the disease heterogeneity which may lead to development of several OA subtypes (phenotypes). Diabetes-associated OA is among the proposed OA phenotypes. The key mechanism involved into inflammatory and degenerative changes in OA is a decrease in DNA methylation suggested for several cell types, that was also demonstrated in type 2 diabetes mellitus. Therefore, pharmacological increase of DNA methylation may be an effective treatment strategy which may exert pleiotropic effects in diabetes-associated OA. In a randomized cross-over study, we have evaluated efficacy and safety of ademetionine, a methyl group donor, in comparison with chondroitine sulfate in patients with OA associated with type 2 diabetes mellitus. The patients were randomly assigned to sequential treatment of chondroitine sulfate/ademetionine or ademetionine/chondroitine sulfate during one month, with a washout period of 2 weeks. The primary endpoint was pain measured according to visual analogue scale (VAS). Painful symptoms, as well as function and disease signs in knee, hip and hand joints were also assessed with KOOS, WOMAC, and FHOA scales. General performance was assessed with SF-36 scale. To evaluate systemic inflammation, we measured serum IL-6, IL-18, adiponectin, and CRP using ELISA technique. Concentrations of serum cartilage destruction biomarkers (aggrecan and antibodies to collagen type II) were assessed by ELISA. Serum lipid levels were measured with standard method; glycated hemoglobin was assessed with liquid chromatography. Ten patients (all women, age 61.7–74.2 year with BMI of 1.1–38.4 kg/m²) were included in the study. It has been demonstrated that ademetionine showed a statistically significant analgetic effect (decrease in VAS pain), improved knee function and reduced symptoms in knee joints (as measured by KOOS subscales), and did not influence the levels of systemic inflammation or cartilage destruction biomarkers. There was also no change in lipid levels and glycated hemoglobin concentrations. Ademetionine was well tolerated, no serious adverse events occurred during the treatment. In conclusion, ademetionine does not have pleiotropic pharmacological effects in diabetes-associated OA. Its potential application in cases of different comorbidities requires further studies.

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

Введение

Остеоартрит (ОА) является одной из актуальных проблем клинической медицины не только вследствие большой распространенности, но и повышенной частоты коморбидной патологии:

ожирение, сахарный диабет (СД), ишемическая болезнь сердца, артериальная гипертензия, инсулинорезистентность, дислипидемия [2, 3, 5, 6]. Большое число сопутствующих заболеваний у больных ОА дает основание обсуждать наличие особых клинических вариантов болезни, в част-

ности ОА, ассоциированного с сахарным диабетом [4, 11, 31], патогенетической роли гипергликемии, конечных продуктов гликирования, инсулинорезистентности в инициации и прогрессии этого фенотипа ОА. Предполагается, что имеются единые патогенетические пути развития входящих в состав полипатии заболеваний («семейство болезней») [9], и это обуславливает поиск новых терапевтических мишеней, обладающих свойствами одновременной регуляции воспаления и нескольких путей метаболизма (углеводного, жирового обмена и др.) [9]. Фармакологическая коррекция активности этих мишеней может приводить к развитию плеiotропного (противовоспалительного, липидкорректирующего, иммуномодулирующего, гипогликемического и др.) действия, патогенетически обоснованного при полипатиях.

Одним из механизмов, лежащим в основе воспалительных и дегенеративных изменений при ОА, присоединения коморбидной патологии, является нарушение эпигенетической регуляции экспрессии генов, в частности изменение процессов метилирования ДНК в хондроцитах, адипоцитах, клетках – эффекторах воспаления [15, 16]. Так, показано, что хондроциты больных ОА характеризуются гипометилированием специфических CpG сайтов в промоторах генов ряда металлопротеиназ, супероксиддисмутазы [25, 26]. С другой стороны, метилирование ДНК не является ключевым компонентом в подавлении синтеза хондроцитами агреккана [22], а снижение экспрессии остеогенного протеина-1 в хондроцитах *in vitro* ассоции-

ровано с гиперметилированием промотора гена этого белка [13]. Показано, что при ожирении, СД – заболеваниях, часто сопутствующих ОА, уровень метилирования ДНК в В-лимфоцитах и НК-клетках значительно повышен [30].

В нескольких исследованиях было продемонстрировано анальгетическое, гипогликемическое, инсулин-сенситизирующее действие фармакологического донора метильной группы S-аденозил L-метионина (SAME) [17, 20, 21]. Эти данные и определили цель исследования: оценить эффективность, безопасность применения SAME (адеметионина) у больных с ОА, ассоциированным с СД (ОАСД), изучить его предполагаемое многоцелевое действие: противовоспалительное, иммуномодулирующее, липидкорректирующее, гипогликемическое.

Материалы и методы

В открытом, рандомизированном, сравнительном, перекрестном исследовании клинической эффективности и безопасности применения адеметионина (SAME) у больных с диабет-ассоциированным ОА, приняло участие 10 женщин, наблюдающихся в Диабетологическом центре города Новосибирска и у ревматолога. Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НИИФКИ, все пациенты подписали форму добровольного информированного согласия. Основные критерии включения:

- возраст 40-70 лет.
- ОА, удовлетворяющий критериям АСР, продолжительность болезни не имеет значения;

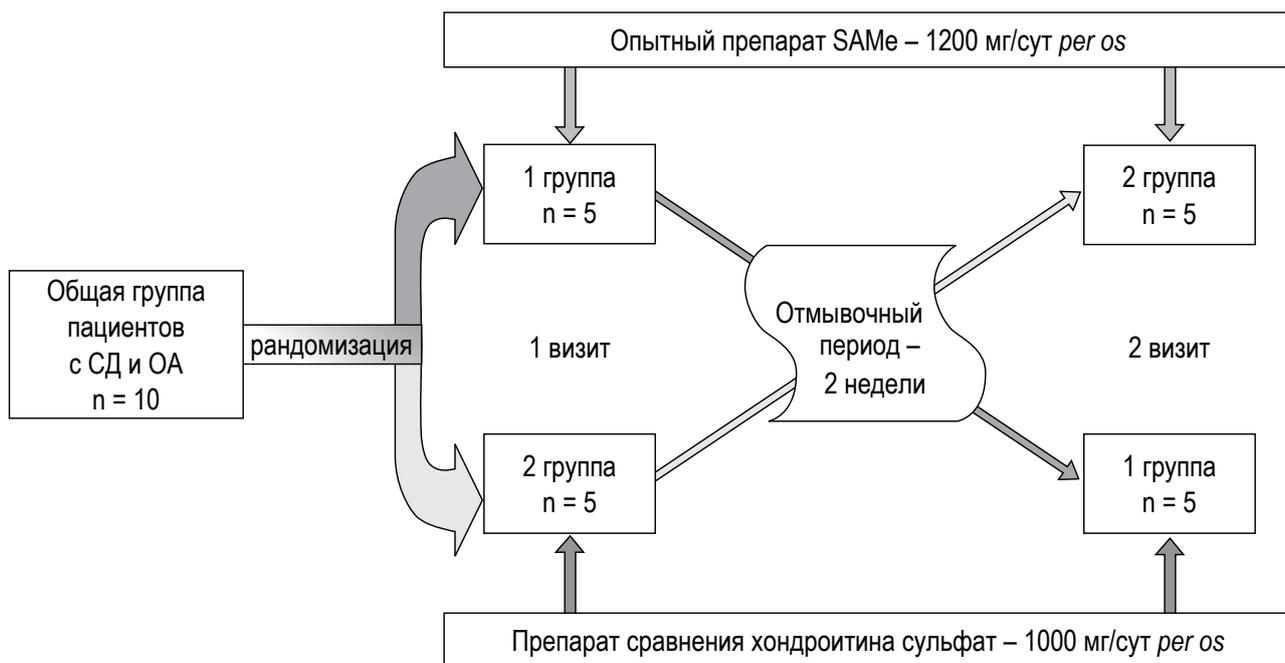


Рисунок 1. Схема исследования

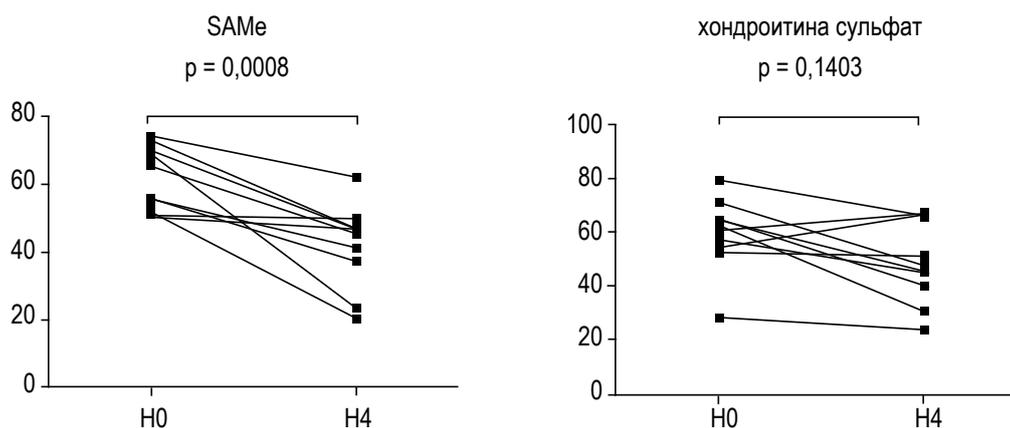


Рисунок 2. Показатели уровня боли у больных ОАСД, получавших адеметионин и хондроитина сульфат

— установленный диагноз СД 2 не менее чем за год до верифицированного диагноза ОА, контролируемый сахарный диабет.

Больные не должны получать нестероидные противовоспалительные и симптом-модифицирующие препараты, опиатные анальгетики в течение месяца до начала исследования. Допускался прием ацетаминофена в стандартных дозировках. В качестве антидиабетического средства больные длительно получали метформин в разных дозировках.

Все больные были пожилого возраста (межквартильные интервалы 61,7-74,2 лет), с избыточной массой тела (индекс массы тела 31,1-38,4 кг/м²). Продолжительность ОА составила 3-9,2 лет, СД — 7,2-20,5 года. Клинические и рентгенологические признаки гонартроза выявлены у 100%, что соответствовало критериям отбора в исследование, у всех больных зарегистрирована третья рентгенологическая стадия ОА (Kellgren–Lawrence).

На рисунке 1 представлен дизайн исследования.

После рандомизации одна группа больных принимала адеметионин в дозе 1200 мг в сутки в течение 4 недель, другая группа препарат сравнения — хондроитина сульфат в дозе 1000 мг в сутки, так же в течение 4 недель. Затем, после двухнедельного периода «отмывки», первая группа больных начинала прием препарата сравнения, вторая адеметионин. Продолжительность лечения после смены препарата — 4 недели. Клиническое и лабораторное обследование проводилось на каждом из четырех визитов пациентов и включало:

— показатели уровня боли по визуально-аналоговой шкале (ВАШ) — первичная конечная точка;

— оценку функционального статуса суставов по шкалам KOOS (Knee/Hip injury and Osteoarthritis Outcome Score) [27], WOMAC Knee, Hip (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index) [10], FHOA (Functional Index of

Hand OA) [14], показатели общего состояния здоровья по шкале SF-36 [32], русскоязычная версия — вторичные конечные точки.

Для оценки системного воспаления определяли содержание IL-6, IL-18 (Вектор-Бест, Россия), адипонектина (Abcam, UK) и СРБ (Витал Девелопмент Корпорэйшн, Россия) в сыворотке ПК, с помощью стандартных наборов для ИФА, согласно инструкции фирм-производителей. Содержание биомаркеров деструкции хряща (агреггана и антител к коллагену II типа) в сыворотке ПК оценивали методом ИФА, используя наборы BlueGeneBiotech, China. Уровень липидов в сыворотке ПК определяли стандартным методом, содержание гликированного гемоглобина — с использованием жидкостной хроматографии. Полученные данные представлены медианой и 25 и 75 межквартильными интервалами. Для выявления различий между сравниваемыми подгруппами использовали непараметрический критерий Вилкоксона.

Результаты и обсуждение

На рисунке 2 представлены данные о влиянии адеметионина и хондроитина сульфата на выраженность боли в суставах после четырех недель лечения. Видно, что статистически значимое уменьшение уровня боли выявлено у больных только после периода лечения адеметионином. Причем статистически значимых различий показателей боли после окончания применения адеметионина и хондроитина сульфата не зарегистрировано.

В таблице 1 представлены результаты оценки суставного синдрома до и после приема адеметионина.

Установлено статистически значимое снижение боли, уменьшение выраженности симптомов в коленных суставах и улучшение показателей

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКИ СУСТАВНОГО СИНДРОМА У БОЛЬНЫХ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ АДЕМЕТИОНИНОМ

Показатели	До приема адеметионина (медиана и межквартильные интервалы)	После приема адеметионина (медиана и межквартильные интервалы)	P
Уровень боли	61,00/ 51,75-70,75	45,50/33,50-47,75	0,0008
KOOS – симптомы	61,11/50-65,27	69,40/63,80-86,10	0,0059
KOOS – субшкала боли	21,43/13,33-35,71	46,40/30,33-50,88	0,0488
KOOS – субшкала повседневной активности	41,91/38,20-51,42	52,15/44,10-57,68	0,0452
Оценка активности ОА врачом (ВАШ)	57/49-62	42/38,75-46,75	0,0059

повседневной активности больного по субшкалам KOOS. После приема адеметионина выявлено уменьшение активности болезни по мнению врача. Другие функциональные показатели, которые были использованы в работе, не претерпели изменений после окончания лечения. Адеметионин хорошо переносился, случаев серьезных и несерьезных нежелательных явлений зарегистрировано не было.

Таким образом, прием адеметионина – донора метильной группы – больными ДАОА в течение месяца уменьшал боль и улучшал функцию коленных суставов. Далее представлялось целесо-

образным оценить фармакодинамику препарата, в частности его влияние на показатели системного воспаления, дегенерации хряща, липидного профиля и уровня гликемии.

Как следует из таблицы 2, в конце лечения адеметионином не выявлено изменений содержания биомаркеров системного воспаления – С-реактивного белка, IL-6, IL-18, адипонектина, деструкции хрящевой ткани – агрекана и антител к коллагену II. Не изменилось также содержание липидов и гликированного гемоглобина. Лечение больных ОА пожилого возраста, которые имеют большое число сопутствующих заболева-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ БИОМАРКЕРОВ В СЫВОРОТКЕ ПК БОЛЬНЫХ ДАОА ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ АДЕМЕТИОНИНОМ

Биомаркеры	До приема адеметионина (медиана и межквартильные интервалы)	После приема адеметионина (медиана и межквартильные интервалы)	P
IL-6 (пг/мл)	2,867/2,402-3,396	2,399/1,777-2,987	0,232
IL-18 (пг/мл)	107,8/61,40-164,5	97,43/67,87-205,6	0,695
Адипонектин (нг/мл)	2959/2150-4419	2988/2392-3640	0,769
СРБ (мг/л)	10,40/6,325-24,38	15,65/9,800-22,95	0,160
Агрекан (нг/мл)	0,5/0,2-2,2	0,3/0,1-0,4	0,193
Антитела к коллагену II (нг/мл)	5/4-6	4,5/4-5	0,625
Общий холестерин (ммоль/литр)	5,8/5,3-6,0	5,7/5,4-6,4	0,492
Холестерин липопротеидов высокой плотности (ммоль/литр)	1,15/0,9-1,5	1,2/1,0-1,3	0,769
Триглицериды (ммоль/ литр)	2,2/1,7-3,6	2,1/1,8-3,6	0,845
Индекс атерогенности	3,3/2,5-5,5	3,4/2,8-5,1	0,845
Гликированный гемоглобин, %	6,5/5-7,5	6,2/4,8-7,6	0,461

ний: сахарный диабет, ожирение, артериальная гипертензия, ишемическая болезнь сердца и др., представляет собой нелегкую задачу. Неслучайно последние рекомендации OARSI [19] по ведению пациентов с ОА нацеливают лечащего врача на «учет коморбидной патологии» при назначении немедикаментозных и медикаментозных вмешательств. Эти рекомендации отвечают требованиям реальной клинической практики, однако раздел «учета коморбидной патологии» рекомендаций, на наш взгляд, требует конкретизации, основанной на более глубоком понимании патогенеза полипатий и результатах клинических испытаний новых или известных лекарственных средств, используемых в лечении коморбидных болезней. Эти средства должны обладать многоцелевым фармакологическим действием, способным уменьшать проявления не только основного, но и сопутствующих заболеваний. Перспективные направления в терапии ОА связывают с применением ингибитора IL-1 диацереина [24], препаратов, способствующих ремоделированию субхондральной кости [1, 23], препаратов гиалуроновой кислоты и рекомбинантного остеогенного протеина-1 [1], агониста рецептора, активируемого пероксисомным пролифератором α фенофибрата [29] и ряда других. Все они в разной степени оказывают анальгетическое и хондропротекторное действие, улучшают функцию суставов при ОА, однако не снижают риска возникновения и развития коморбидной патологии.

S-аденозил-L-метионин (SAMe, адеметионин) является производным L-метионина и аденозинтрифосфорной кислоты природного происхождения, которое синтезируется в печени [7, 8]. SAMe распространен во всех биологических системах организма и вовлечен в разнообразные метаболические процессы, наиболее важные из которых: трансметилирование, транссульфирование и аминопропилирование. В этих реакциях он выступает либо как донор метильной группы, либо как индуктор ферментов, и это определяет многообразие биологических эффектов адеметионина.

Разностороннее действие адеметионина на метаболизм обосновали его использование при заболеваниях печени с целью профилактики и лечения внутрипеченочного холестаза, защиты печени от гепатотоксических веществ. Адеметионин является главным источником метильных групп в клетках головного мозга, что послужило основанием для проведения нескольких рандомизированных клинических испытаний эффективности адеметионина у больных депрессиями разной степени тяжести [12]. Было показано достоверное (на 38-60%) превышение его антидепрессивной активности над активностью плацебо. Эффективность была равноценна действию

стандартных три- и гетероциклических антидепрессантов, а профиль безопасности значительно выше. Возможно, анальгетическое действие адеметионина у больных ДАОА, зарегистрированное в настоящем исследовании, обусловлено уменьшением депрессии, которая выявляется у больных ОА очень часто, и ее медикаментозное лечение приводит к снижению выраженности боли и улучшению суставной функции [18]. Обезболивающее действие и улучшение функции суставов при назначении адеметионина больным ОА, сопоставимое с приемом нестероидного противовоспалительного средства целекоксиба, было показано в работе Najm W.I. [20]. В 2009 году в Кокрановской библиотеке появился систематизированный обзор, посвященный анализу результатов оценки эффективности применения адеметионина у больных ОА [28]. Авторы включили в работу четыре плацебо-контролируемых исследования эффективности и безопасности приема адеметионина у 656 больных ОА тазобедренных и коленных суставов. По их мнению, в обобщенных работах имеется ряд методологических ошибок, что не позволяет рекомендовать использование адеметионина в лечении ОА и требует проведения более качественных рандомизированных клинических испытаний. Результаты некоторых исследований позволяют предположить, что применение адеметионина больными сахарным диабетом 2 оказывает гипогликемическое действие. Показано, что содержание SAMe в эритроцитах больных СД 2 типа уменьшено по сравнению со здоровыми людьми. При этом выраженность снижения концентрации SAMe коррелирует с более быстрой прогрессией диабетической нефропатии [21]. В экспериментальной модели диабета у крыс применение SAMe повышает чувствительность к инсулину [17]. В настоящем исследовании не установлено гипогликемического, а также противовоспалительного действия адеметионина при назначении больным ДАОА, его влияния на процесс разрушения хряща, что свидетельствует об отсутствии у препарата плейотропного эффекта.

В заключение следует отметить, что результаты пилотных исследований эффективности и безопасности применения адеметионина у больных диабет-ассоциированным ОА выявили его умеренное позитивное влияние только на некоторые клинические и функциональные показатели выраженности суставного синдрома, что дает основания для проведения более крупных рандомизированных клинических испытаний препарата у больных ОА, сочетающимся с коморбидной патологией, возможно, в комбинации с другими препаратами с плейотропным действием.

Список литературы / References

1. Алексеева Л.И., Зайцева Е.М. Перспективные направления терапии остеоартроза // Научно-практическая ревматология, 2014. Т. 52, № 3. С. 247-250. [Alexeeva L.I., Zaitseva E.M. Perspective directions of osteoarthritis therapy. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2014, Vol. 52, no. 3, pp. 247-250. (In Russ.)]
2. Анкудинов А.С. Проблемы сердечно сосудистой коморбидности при остеоартрозе // Современные проблемы ревматологии, 2013. № 5. С. 22-31. [Ankudinov A.S. Problems cardiovascular comorbidity in osteoarthritis. *Sovremennye problemy revmatologii = Modern Problems in Rheumatology*, 2013, no. 5, pp. 22-31. (In Russ.)]
3. Березняков И.Г., Корж И.В. Остеоартроз, артериальная гипертензия и ожирение: проблемы коморбидности // Международный медицинский журнал, 2012. № 4. С. 78-81. [Bereznayakov I.G., Korzh I.V. Osteoarthritis, arterial hypertension, and obesity: comorbidity problem. *Mezhdunarodnyy meditsinskiy zhurnal = The International Medical Journal*, 2012, no. 4, pp. 78-81. (In Russ.)]
4. Головкина Е. С. Течение гонартроза и коксартроза на фоне сахарного диабета // Боль. Суставы. Позвоночник, 2012. Т.4, № 8. С. 34-38. [Golovkina E.S. The course of gonarthrosis and coxarthrosis in patients with diabetes mellitus. *Bol'. Sustavy. Pozvonochnik = Pain. Joints. Spine*, 2012, Vol. 4, no. 8, pp. 34-38. (In Russ.)]
5. Денисов Л. Н., Насонова В. А. Ожирение и остеоартроз // Научно-практическая ревматология, 2010. № 3. С. 48-51. [Denisov L.N., Nasonova V.A. Ozhirenie i osteoartroz. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2011, no. 3, pp. 48-52. (In Russ.)]
6. Наумов А.В., Верткин А.Л., Алексеева Л. И., Шамуплова М.М., Мендель О.А., Лучихина А.В. Остеоартроз и сердечно-сосудистые заболевания. Общие факторы риска и клинико-патогенетические взаимосвязи // Профилактическая медицина, 2010. № 3. С. 35-41. [Naumov A.V., Vertkin A.L., Alexeev L.I., Shamuplova M.M., Mendel O.A., Luchikhina A.V. Osteoarthritis and cardiovascular diseases. Overall risk factors and clinical and pathogenetic relationships. Therapy optimization. *Profilakticheskaya meditsina = Preventive Medicine*, 2010, no. 3, pp. 35-41. (In Russ.)].
7. Подымова С.Д. Адеметионин: фармакологические эффекты и клиническое применение препарата // Русский медицинский журнал, 2010. Т. 18. С. 800-805. [Podymova S.D. Ademetionine: pharmacological effects and clinical use of the drug. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2010, Vol. 18, pp. 800-805. (In Russ.)]
8. Птицина С.Н. Уникальная роль адеметионина в метаболизме клетки и его фармакологический потенциал // Фарматека, 2010. № 20. С. 26-34. [Ptitsina S.N. Unique Role Of Ademetionine In Cell Metabolism And Its Pharmacological Potential. *Farmateka = Pharmateca*, 2010, no. 20, pp. 26-34. (In Russ.)]
9. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Коморбидные заболевания – актуальная проблема клинической медицины // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29., № 1. С. 7-12. [Shirinsky V.S., Shirinsky I.V. Comorbid diseases as an important problem of clinical medicine. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 29, no. 1, pp. 7-12. (In Russ.)]
10. Bellamy N., Buchanan W.W., Goldsmith C.H., Campbell J., Stitt L.W. Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic Drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J. Rheumatol.*, 1988, no. 15, pp. 1833-1840.
11. Berenbaum F. Diabetes – induced osteoarthritis from a new paradigm to a new phenotype. *Ann. Rheum. Diseases*, 2011, Vol. 70, no. 8, pp. 1354-1356.
12. Bressa G.M. S-adenosyl-L-methionine (SAM) as antidepressant: meta-analysis of clinical studies. *Acta Neuro Scand.*, 1994, no. 89, pp. 4-14.
13. Chubinskaya S., Otten L., Soeder S., Borgia J.A., Aigner T., Rueger D.C., Loeser R.F. Regulation of chondrocyte gene expression by osteogenic protein-1. *Arthritis Res. Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 2, pp. 2-14.
14. Dreiser R.L., Macheu E., Guillou G.B. Validation of an algofunctional index for the Hand. *Rev. Rheum. Engl. Ed.*, 1995, no. 6, pp. 435-535.
15. Goldring M.B., Kenneth B.M. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis and osteoarthritis. *Trends Mol. Med.*, 2012, Vol. 18, no. 2, pp. 109-118.
16. Gonzales A. Osteoarthritis year 2013 in review: genetics and genomics. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 10, pp. 1443-1451.
17. Jin C.J., Park H.K., Cho Y.M., Pak Y.K., Lee K.U., Kim M.S. S-adenosyl-L-methionine increases skeletal muscle mitochondrial DNA density and whole body insulin sensitivity in OLETF rats. *J. Nutr.*, 2007, Vol. 137, no. 2, pp. 339-344.
18. Lin E.H., Katon W., Von Korff M., Tang L., Williams J.W., Jr. Kroenke. Effect of improving depression care on pain and functional outcomes among older adults with arthritis: a randomized controlled trial. *JAMA*, 2003, Vol. 290, no. 18, pp. 2428-2429.
19. McAlindon T.E., Bannuru R.R., Sullivan M.C., Arden N.K., Berenbaum F., Bierma-Zeinstra S.M., Hawker G.A., Henrotin Y., Hunter D.J., Kawaguchi H., Kwok K., Lohmander S., Rannou F., Roos E.M., Underwood M. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, Vol. 22, no. 3, pp. 363-388.

20. Najm W.I., Reinsch S., Hoehler F., Tobis J.S., Harvey P.W. S-adenosyl methionine (SAME) versus celecoxib for the treatment of osteoarthritis symptoms: a double-blind cross-over trial. *Musculoskelet Disord.*, 2004, Vol. 5, pp. 1471-2474.
21. Poirier L.A., Brown A.T., Fink L.M., Wise C.K., Randolph C.J., Delongchamp R.R. Blood S-adenosylmethionine concentrations and lymphocyte methylenetetrahydrofolate reductase activity in diabetes mellitus and diabetic nephropathy. *Metabolism*, 2001, Vol. 50, no. 9, pp. 1014-1018.
22. Pöschl E., Fidler A., Schmidt B., Kallipolitou A., Schmid E., Aigner T. DNA methylation is not likely to be responsible for aggrecan down regulation in aged or osteoarthritic cartilage. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, Vol. 64, no. 3, pp. 477-480.
23. Reginster J.-Y., Badurski J., Bellamy N. Efficacy and safety of strontium ranelate in the treatment of knee osteoarthritis: results of a double-blind, randomized placebo-controlled trial. *Ann Rheum Dis*, 2013, Vol. 72, no. 2, pp. 179-186.
24. Rintelen B., Neumann K., Leeb B.F. A meta-analysis of controlled clinical studies with diacerhein in the treatment osteoarthritis. *Arch. Int. Med.*, 2006, no. 166, pp. 1899-1906.
25. Roach H.I., Aigner T. DNA methylation in osteoarthritic chondrocytes: a new molecular target. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007, no. 15, pp. 128-137.
26. Roach H.I., Yamada N., Cheung K.S., Tilley S., Clarke N.M., Oreffo R.O., Kokubun S., Bronner F.H., Yamada N., Cheung K.S., Tilley S., Clarke N.M., Oreffo R.O., Kokubun S., Bronner F. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum.*, 2005, Vol. 52, no. 10, pp. 3110-3124.
27. Roos E.M., Roos H.P., Lohmander L.S., Ekdahl C., Beynon B.D. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS)-development of a self-administered outcome measure. *J. Orthop. Sports Phys. Ther.*, 1998, no. 28, pp. 88-96.
28. Rutjes A.W., Nuesch E., Reichenbach S., Juni P. S-Adenosylmethionine for osteoarthritis of the knee or hip. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2009, no. 4.
29. Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Treatment of erosive osteoarthritis with peroxisome proliferator-activated receptor alpha agonist fenofibrate: a pilot study. *Rheumatol. Int.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 613-616.
30. Simar D., Verstehe S., Donkin I., Liu J., Hesson L., Nylander V., Fossum A., Barrès R. 'DNA methylation is altered in B and NK lymphocytes in obese and type 2 diabetic human. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2014, Vol. 63, no. 9, pp. 1188-1197.
31. Trifonova E.P., Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Shirinsky V.S. Clinical and laboratory correlates of diabetes – induced knee osteoarthritis severity. *Ann. Rheum. Dis.*, 2013, Suppl. 3, p. 971.
32. Ware J.E. The MOS 36 – item Short – Form Health Survey. *Medical Care*, 1992, Vol. 30, no. 6, pp. 473-483.

Авторы:

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

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

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

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

Authors:

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

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

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

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

Поступила 27.04.2015
Принята к печати 24.09.2015

Received 27.04.2015
Accepted 24.09.2015

ОСТРАЯ ФАЗА СИСТЕМНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА ПОСЛЕ ОДНОПОРТОВОЙ ЛАПАРОСКОПИЧЕСКОЙ ХОЛЕЦИСТЭКТОМИИ

Алекберзаде А.В., Липницкий Е.М., Бадалов Д.А.

Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Резюме. У 64 больных с диагнозом «хронического калькулезного холецистита», перенесших ЛХЭ, проследили течение острой фазы системного воспалительного ответа в раннем послеоперационном периоде. Их разделили на 2 группы в зависимости от способа операции: основная группа – 32 больных, перенесших однопортовую ЛХЭ, и контрольная группа – такое же количество больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ. У всех больных брали образцы крови из периферической вены за 2 ч до операции и через 6 ч, 24 ч и 48 ч после нее. Определяли уровни А1АТ, CRP, TNF α и IL-1 β . Как в основной, так и контрольной группе сравнение уровней А1АТ после операции с его исходными показателями не выявило статистически значимых различий. Сопоставление в сравниваемых группах показало статистически значимое повышение уровня А1АТ через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ. У больных, перенесших однопортовую ЛХЭ, исходный и послеоперационные уровни CRP статистически значимо не различались. В контрольной группе его уровень оказался статистически значимо выше по сравнению с исходным через 6 ч после операции. При сравнении двух групп уровень CRP оказался статистически значимо выше у больных контрольной группы через 6 ч и 24 ч после операции. Послеоперационные уровни TNF α у больных после однопортовой ЛХЭ по сравнению с дооперационным уровнем оказались выше, но различия не были статистически значимыми. Статистически значимое увеличение его уровня по сравнению с исходным отмечалось через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ. При сопоставлении основной и контрольной групп уровень TNF α был статистически значимо выше через 24 ч у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ. Уровень IL-1 β у больных основной группы до и после хирургического вмешательства статистически значимо не различался. Статистически значимое повышение его уровня по сравнению с исходным наблюдалось в контрольной группе через 24 ч после операции. Сравнение уровня IL-1 β в двух группах показало его статистически значимое повышение через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ. Вышеизложенное позволяет прийти к выводу, что течение острой фазы системного воспалительного ответа после однопортовой ЛХЭ имеет особенности, заключающиеся в краткосрочной и менее выраженной воспалительной активности по сравнению с таковой у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ.

Ключевые слова: лапароскопия, холецистэктомия, α -1-антитрипсин, С-реактивный белок, TNF α , IL-1 β

Адрес для переписки:

*Алекберзаде Афтандил Вагиф оглы
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова
129128, Россия, Москва, Будайский проезд, 7, корп. 1,
кв. 47.
Тел.: 8 (965) 133-00-00.
E-mail: aftandil_alekber@mail.ru*

Address for correspondence:

*Alekberzade Aftandil V. ogly
First Moscow State I.M. Sechenov Medical University
129128, Russian Federation, Moscow, Budaisky Lane, 7,
bldg 1, apt 47.
Phone: 7 (965) 133-00-00.
E-mail: aftandil_alekber@mail.ru*

Образец цитирования:

*А.В. Алекберзаде, Е.М. Липницкий, Д.А. Бадалов,
«Острая фаза системного воспалительного ответа после
однопортовой лапароскопической холецистэктомии»
// Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 561-566.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-561-566*

© Алекберзаде А.В. и соавт., 2015

For citation:

*A.V. Alekberzade, E.M. Lypnitskiy, D.A. Badalov, "Acute
phase of systemic inflammatory response following a single-port
laparoscopic cholecystectomy", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 561-566.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-561-566*

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-561-566>

ACUTE PHASE OF SYSTEMIC INFLAMMATORY RESPONSE FOLLOWING A SINGLE-PORT LAPAROSCOPIC CHOLECYSTECTOMY

Alekbierzade A.V., Lypnitskiy E.M., Badalov J.A.

First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Early course of acute systemic inflammatory response after surgical intervention was traced for sixty-four patients with chronic calculous cholecystitis following a laparoscopic cholecystectomy (LCE). The patients were classified in 2 groups dependent on the surgery mode. The main group included 32 patients after single-port LCE, and controls that underwent four-port LCE (n = 32). Peripheral blood samples were taken 2 h before intervention, as well as 6, 24, and 48 h after surgical treatment. of Alpha-1-antitrypsin (A1AT), C-reactive protein, TNF α and IL-1 β levels were measured in the specimens. For A1AT, we have not found any significant differences between the baseline and post-surgery levels, both in main and control groups. The intergroup comparisons showed a statistically significant increase in A1AT levels 24 h after the 4-port LCE. The patients subjected to single-port LCE, exhibited similar pre- and post-surgery levels of C-reactive protein. In the control group, its level proved to be statistically higher against initial values 6 h after the surgery. Comparing the both groups, C-reactive protein was found to be significantly increased in controls 6 и 24 h after surgery. The post-op TNF α levels after the single-port LCE tended to increase, as compared to the baseline values. A statistical increase of TNF levels over initial values was noted 24 h after the 4-port LCE. Upon the intergroup comparisons, a significant TNF increase was revealed 24 following the 4-port LCE. IL-1 β levels in the main group did not differ between the pre- and post-surgical period. However, its statistically significant increase to the initial values was revealed in controls 24 h after surgery. A comparison for IL-1 β levels between the 2 groups has shown its significant elevation 24 h after the 4-port LCE. These data allow to conclude that a systemic inflammatory response as assessed by acute phase proteins in patients after a single-port LCE, is characterized by a shorter and less marked inflammatory reaction, as compared to the reaction in patients after the 4-port LCE.

Keywords: laparoscopy, cholecystectomy, α -1-antitrypsin, CRP, TNF α , IL-1 β

На сегодняшний день лапароскопическая холецистэктомия (ЛХЭ) является «золотым стандартом» в лечении доброкачественных заболеваний желчного пузыря [6].

После внедрения лапароскопической хирургии в 1980 г. [4], намечалась заметная тенденция к переходу от открытой к ЛХЭ. Эта операция приобрела популярность как среди хирургов, так и среди пациентов благодаря ее таким неоспоримым преимуществам, как маленький разрез, уменьшение послеоперационной боли, сокращение срока госпитализации и быстрое восстановление трудоспособности по сравнению с открытой холецистэктомией [3]. С конца 1990-х гг. стала внедряться в практику однопортовая ЛХЭ [2, 5, 7].

Физиологические механизмы, ответственные за увеличение риска послеоперационных осложнений, до сегодняшнего дня остаются неизученными. Стресс, инициированный хирургическим вмешательством, способствует, хотя транзитор-

ному, но глубокому истощению всех видов циркулирующих лимфоцитов, что может привести к значительной послеоперационной иммунодепрессии [1]. Наряду с этим, повреждение клеток, вызванное как травмой, так и хирургическим вмешательством, провоцирует местные и системные воспалительные реакции, которые составляют сложную сеть молекулярных и клеточных взаимодействий. Эти изменения преследуют цель – ускорение возвращения к физиологическому гомеостазу и восстановлению тканей. Такой ответ иммунной системы организма состоит как из местных реакций, так и системной активации, вызванной цитокинами. Таким образом, особенности системного воспалительного ответа играют одну из решающих ролей в течении послеоперационного периода. Несмотря на важность, в анализируемой литературе не описано исследований, сравнивающих особенности течения системного воспалительного ответа у больных, перенесших однопортовую и четырехпор-

товую ЛХЭ. Установление ключевых изменений показателей иммунного статуса могло бы помочь в разработке и внедрении в практику патогенетически обоснованного предупреждения и лечения послеоперационных инфекционно-воспалительных осложнений после ЛХЭ.

Целью исследования явился сравнительный анализ течения острой фазы системного воспалительного ответа у больных, перенесших однопортовую и четырехпортовую ЛХЭ.

В исследование вошли 64 больных с диагнозом «хронического калькулезного холецистита», перенесших ЛХЭ. Их разделили на 2 группы в зависимости от способа хирургического вмешательства:

I группа (основная) состояла из 32 больных, перенесших однопортовую ЛХЭ;

II группа (контрольная) состояла из такого же количества больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ.

У всех больных из периферической вены брали образцы крови за 2 ч до операции и через 6 ч, 24 ч и 48 ч после нее с последующим определением уровней протеинов – α 1-антитрипсина (А1АТ) и С-реактивного белка (CRP) и провоспалительных цитокинов – фактора некроза опухоли- α (TNF α) и интерлейкина-1 β (IL-1 β) острой фазы системного воспалительного ответа.

По основным анамнестическим и клиническим критериям, способным повлиять на исследуемые показатели, между сравниваемыми группами статистически значимых различий не было.

Для проведения статистических анализов цифровых данных, полученных в ходе исследования, использовали программу SPSS (SPSS, Chicago, IL, USA). При значении $p < 0,05$ различия были приняты статистически значимыми.

Анализ цифровых данных, полученных при измерении вышеперечисленных показателей, выявил следующее.

Сравнение показателей уровня А1АТ после однопортовой ЛХЭ с его исходным показателем не выявило статистически значимых различий во всех точках измерения времени. Так, исходный уровень А1АТ после однопортовой ЛХЭ составил $1,88 \pm 0,67$, через 6 ч после операции – $2,12 \pm 0,81$ ($p = 0,201$), через 24 ч – $2,13 \pm 0,73$ ($p = 0,159$) и через 48 ч – $2,23 \pm 0,79$ ($p = 0,061$).

В группе больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ, наблюдалось статистически незначимое увеличение показателей уровня А1АТ по сравнению с его исходным уровнем через 24 ч и 48 ч после операции. Так, исходный А1АТ составлял $2,18 \pm 0,75$, через 6 ч после хирургического вмешательства – $2,17 \pm 0,61$ ($p = 0,954$), через 24 ч – $2,59 \pm 0,98$ ($p = 0,065$) и через 48 ч – $2,27 \pm 0,77$ ($p = 0,637$).

Уровни А1АТ за 2 ч до операции статистически значимо не различались у больных основной и контрольной группы, составляя $1,88 \pm 0,67$ и $2,18 \pm 0,75$ ($p = 0,097$) соответственно. При сопоставлении показателей уровня А1АТ между сравниваемыми группами было обнаружено статистически значимое повышение его через 24 ч после операции у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ. Так, показатель уровня А1АТ в основной и контрольной группах через 6 ч после операции составил $2,12 \pm 0,81$ и $2,17 \pm 0,61$ ($p = 0,781$), через 24 ч – $2,13 \pm 0,73$ и $2,59 \pm 0,98$ ($p = 0,037$) и через 48 ч – $2,23 \pm 0,79$ и $2,27 \pm 0,77$ ($p = 0,838$) соответственно (табл. 1).

Между показателями исходного и послеоперационного уровня CRP у больных, перенесших ЛХЭ единым доступом, во всех точках измерения времени статистически значимых различий выявлено не было. Так, дооперационный уровень CRP составлял $2,48 \pm 1,02$, через 6 ч по-

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ А1АТ В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ (n = 64)

Показатель	Группа	Время до и после операции (ч)			
		за 2 ч до операции	после операции		
			6	24	48
α 1-антитрипсин	основная (n = 32)	$1,88 \pm 0,67$	$2,12 \pm 0,81$	$2,13 \pm 0,73$	$2,23 \pm 0,79$
	контрольная (n = 32)	$2,18 \pm 0,75$	$2,17 \pm 0,61$	$2,59 \pm 0,98$	$2,27 \pm 0,77$
p		0,097	0,781	0,037	0,838

ТАБЛИЦА 2. УРОВЕНЬ CRP В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ (n = 64)

Показатель	Группа	Время до и после операции (ч)			
		за 2 ч до операции	после операции		
			6	24	48
С-реактивный белок	основная (n = 32)	2,48±1,02	2,76±1,06	2,87±1,03	2,99±1,10
	контрольная (n = 32)	2,98±1,09	3,70±1,13	3,51±1,16	3,31±1,29
p		0,063	0,001	0,009	0,067

сле операции достиг $2,76 \pm 1,06$ ($p = 0,286$), через 24 ч – $2,87 \pm 1,03$ ($p = 0,133$), а через 48 ч равнялся $2,99 \pm 1,10$ ($p = 0,059$).

У больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ, показатель уровня CRP оказался статистически значимо выше по сравнению с его исходным уровнем через 6 ч после операции. Так, исходный уровень CRP составил $2,98 \pm 1,09$, через 6 ч после операции стал $3,70 \pm 1,13$ ($p = 0,012$), через 24 ч достиг $3,51 \pm 1,16$ ($p = 0,064$), а через 48 ч составил $3,31 \pm 1,29$ ($p = 0,273$).

Дооперационные уровни CRP в сравниваемых группах статистически значимо не различались, составляя в основной группе $2,48 \pm 1,02$ и $2,98 \pm 1,09$ – в контрольной ($p = 0,063$). При сравнении уровней CRP между этими группами было обнаружено, что через 6 ч и 24 ч после операции показатели оказались статистически значимо выше у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ. Так, через 6 ч после ЛХЭ единым доступом и четырехпортовой ЛХЭ уровень CRP составил $2,76 \pm 1,06$ и $3,70 \pm 1,13$ ($p = 0,001$), через 24 ч стал $2,87 \pm 1,03$ и $3,51 \pm 1,16$ ($p = 0,009$) и через 48 ч – $2,99 \pm 1,10$ и $3,31 \pm 1,29$ ($p = 0,067$) соответственно (табл. 2).

Послеоперационные показатели уровня TNF α у больных после однопортовой ЛХЭ по сравнению

с дооперационными показателями оказались статистически незначимо выше во всех точках измерения времени. Так, показатель TNF α за 2 ч до операции составлял $3,77 \pm 1,03$, через 6 ч после однопортовой ЛХЭ оказался $4,18 \pm 1,01$ ($p = 0,113$), через 24 ч – $4,23 \pm 1,04$ ($p = 0,080$), а через 48 ч составил $4,20 \pm 1,07$ ($p = 0,107$).

После четырехпортовой ЛХЭ статистически значимое увеличение уровня TNF α по сравнению с исходным отмечалось через 24 ч после операции. Так, показатель уровня TNF α за 2 ч до операции составлял $3,86 \pm 1,08$, через 6 ч после операции оказался $4,28 \pm 1,07$ ($p = 0,123$), через 24 ч достиг $6,38 \pm 1,21$ ($p = 0,000$) и через 48 ч снизился до $4,31 \pm 1,02$ ($p = 0,092$).

При сравнении этих показателей в основной и контрольной группах уровень TNF α был статистически значимо выше через 24 ч у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ. Если уровень TNF α в группах больных, перенесших однопортовую и четырехпортовую ЛХЭ, за 2 ч до операции составлял $3,77 \pm 1,03$ и $3,86 \pm 1,08$ ($p = 0,734$), то через 6 ч после операции достиг $4,18 \pm 1,01$ и $4,28 \pm 1,07$ ($p = 0,712$), через 24 ч равнялся $4,23 \pm 1,04$ и $6,38 \pm 1,21$ ($p = 0,000$), а через 48 ч стал $4,20 \pm 1,07$ и $4,31 \pm 1,02$ ($p = 0,675$) соответственно (табл. 3).

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ TNF α В СРАВНИВАЕМЫХ ГРУППАХ ДО И ПОСЛЕ ОПЕРАЦИИ (n = 64)

Показатель	Группа	Время до и после операции (ч)			
		за 2 до операции	после операции		
			6	24	48
Фактор некроза опухоли- α	основная (n = 32)	3,77±1,03	4,18±1,01	4,23±1,04	4,20±1,07
	контрольная (n = 32)	3,86±1,08	4,28±1,07	6,38±1,21	4,31±1,02
p		0,734	0,712	0,000	0,675

Показатели уровня IL-1 β у больных до и после ЛХЭ единым доступом статистически значимо не различались. Так, уровень IL-1 β за 2 ч до хирургического вмешательства составлял $2,71 \pm 0,87$, через 6 ч после операции стал $3,05 \pm 1,01$ ($p = 0,154$), через 24 ч достиг $3,13 \pm 0,93$ ($p = 0,067$) и через 48 ч равнялся $3,11 \pm 0,92$ ($p = 0,079$).

Статистически значимое повышение послеоперационных показателей уровня IL-1 β по сравнению с исходным было выявлено через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ. Так, исходный уровень IL-1 β был $2,83 \pm 0,98$, через 6 ч после операции составил $3,04 \pm 0,96$ ($p = 0,390$), через 24 ч достиг $4,92 \pm 0,97$ ($p = 0,000$) и через 48 ч равнялся $3,23 \pm 1,03$ ($p = 0,117$).

При сравнении показателей уровня IL-1 β в основной и контрольной группах они были статистически значимо высоки через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ. Так, уровни IL-1 β за 2 ч до однопортовой и четырехпортовой ЛХЭ составляли $2,71 \pm 0,87$ и $3,23 \pm 1,03$ ($p = 0,606$), через 6 ч после операции – $3,05 \pm 1,01$ и $3,04 \pm 0,96$ ($p = 0,968$), через 24 ч достигли $3,13 \pm 0,93$ и $4,92 \pm 0,97$ ($p = 0,000$), а через 48 ч равнялись $3,11 \pm 0,92$ и $3,23 \pm 1,03$ ($p = 0,625$) соответственно.

Таким образом, наблюдалась тенденция к повышению уровня А1АТ как после однопортовой, так и после четырехпортовой ЛХЭ. При этом сравнение послеоперационных уровней А1АТ с его исходным уровнем не выявило статистически значимых различий во всех точках измерения времени в обеих группах больных. При сопоставлении уровня А1АТ в основной и контрольной группах было обнаружено статистически значимое повышение его через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ.

Также наблюдалось повышение уровня CRP во всех точках измерения времени как после однопортовой, так и после четырехпортовой ЛХЭ. При этом между исходным и послеоперационными уровнями CRP у больных, перенесших однопортовую ЛХЭ, статистически значимых различий во всех точках измерения времени выявлено не было. У больных, перенесших че-

тырехпортовую ЛХЭ, уровень CRP оказался статистически значимо выше по сравнению с исходным через 6 ч после операции. При сравнении уровня CRP в основной и контрольной группах было обнаружено, что через 6 ч и 24 ч после операции показатели оказались статистически значимо выше у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ.

Отмечалось повышение уровня TNF α по сравнению с его исходными показателями во всех точках измерения времени в обеих группах больных. При этом послеоперационные показатели TNF α у больных после однопортовой ЛХЭ сравнению с дооперационными показателями оказались статистически незначимо выше. У больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ, статистически значимое увеличение уровня TNF α по сравнению с исходным отмечалось через 24 ч после операции. При сравнении этих показателей в основной и контрольной группах уровень TNF α был статистически значимо выше через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ.

Выявлено повышение уровня IL-1 β по сравнению с его исходными показателями во всех точках измерения времени после однопортовой и четырехпортовой ЛХЭ. При этом показатели уровня IL-1 β у больных до и после однопортовой ЛХЭ статистически значимо не различались. Статистически значимое повышение послеоперационных показателей IL-1 β по сравнению с исходными было выявлено через 24 ч после четырехпортовой ЛХЭ. При сравнении двух групп показатели IL-1 β были статистически значимо высоки через 24 ч у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ.

Вышеизложенное позволяет прийти к выводу, что течение острой фазы системного воспалительного ответа после однопортовой ЛХЭ имеет особенности, заключающиеся в краткосрочной и менее выраженной воспалительной активности по сравнению с таковой у больных, перенесших четырехпортовую ЛХЭ.

Список литературы / References

1. Angele M.K., Faist E. Clinical review: immunodepression in the surgical patient and increased susceptibility to infection. *Crit. Care*, 2002, no. 6, pp. 298-305.
2. Bresadola F., Pasqualucci A., Donini A., Chiarandini P., Anania G., Terrosu G., Sistu M.A., Pasetto A. Elective transumbilical compared with standard laparoscopic cholecystectomy. *Eur. J. Surg.*, 1999, no. 165, pp. 29-34.
3. Keus F., de Jong J.A., Gooszen H.G., van Laarhoven C.J. Laparoscopic versus open cholecystectomy for patients with symptomatic cholelithiasis. *Cochrane Database Syst. Rev.*, 2006, Vol. 18, no. 4.
4. Mühe E. Long-Term Follow-Up after Laparoscopic Cholecystectomy. *Endoscopy*, 1992, no. 24, pp. 754-758.

5. Navarra G., Pozza E., Occhionorelli S., Carcoforo P., Donini I. One-wound Laparoscopic Cholecystectomy. *Br. J. Surg.*, 1997, no. 84, p. 695.
6. Pisanu A., Reccia I., Porceddu G., Uccheddu A. Meta-analysis of prospective randomized studies comparing single-incision laparoscopic cholecystectomy (SILC) and conventional multiport laparoscopic cholecystectomy (CMLC). *J. Gastrointest Surg.* 2012, no. 16 (9), pp. 1790-1801.
7. Piskun J., Rajpal S. Transumbilical laparoscopic cholecystectomy utilizes no incisions outside the umbilicus. *J. Laparoendosc. Adv. Surg. Tech.*, 1999, no. 9, pp. 361-364.

Авторы:

Алекберзаде А.В. оглы — д.м.н., профессор кафедры хирургии медико-профилактического факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Липницкий Е.М. — д.м.н., профессор кафедры хирургии медико-профилактического факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Бадалов Д.А. оглы — аспирант кафедры хирургии медико-профилактического факультета Первого Московского государственного медицинского университета им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

Authors:

Alekbierzade A.V. ogly, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Surgery, Faculty of Clinical and Preventive Medicine, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Lypnitskiy E.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Surgery, Faculty of Clinical and Preventive Medicine, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Badalov J.A. ogly, Postdoctoral Fellow, Department of Surgery, Faculty of Clinical and Preventive Medicine, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 30.05.2015
Отправлена на доработку 15.06.2015
Принята к печати 20.10.2015

Received 30.05.2015
Revision received 15.06.2015
Accepted 20.10.2015

ГЕН РЕЦЕПТОРА ИНТЕРЛЕЙКИНА 28 АЛЬФА IL28RA И ПСОРИАЗ: АССОЦИАЦИЯ С ТЯЖЕСТЬЮ БОЛЕЗНИ И ВОЗРАСТОМ МАНИФЕСТАЦИИ

Галимова Э.С., Хуснутдинова Э.К.

Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия

Резюме. Молекулярные основы патогенеза псориаза, хронического воспалительного дерматоза, остаются неясными, но основные патоморфологические изменения кожи – нарушение дифференцировки и гиперпролиферация кератиноцитов, рост и расширение кровеносных сосудов и инфильтрация лейкоцитов дермы и эпидермиса – обусловлены действием различных цитокинов и хемокинов, продуцируемых иммунными клетками. Таким образом, целью данной работы является репликативный анализ ассоциаций полиморфного варианта rs4649203 гена *IL28RA* с риском развития псориаза. В работе использованы образцы ДНК 341 больных псориазом и 407 здоровых доноров. Генотипирование полиморфного локуса rs4649203 гена *IL28RA* было проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием CFX 96™ Real-Time Cyler (BioRad). Настоящим исследованием установлено, что полиморфный вариант гена *IL28RA* играет важную роль как в патогенезе псориаза, так в клиническом течении и манифестации заболевания. Полученные результаты могут быть использованы для разработки персонализированного подхода в тактике лечения пациентов.

Ключевые слова: ассоциация, псориаз, генетика, гены интерферонов лямбда, *IFNλR1*, *IL28RA*

INTERLEUKIN 28 RECEPTOR GENE ALPHA IL28RA AND PSORIASIS: ASSOCIATION WITH DISEASE SEVERITY AND AGE AT ONSET

Galimova E.S., Khusnutdinova E.K.

Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Abstract. Molecular basis still remains unclear for psoriasis, a chronic inflammatory skin disease. Its biological features are presented by abnormal differentiation of epidermal keratinocytes, overgrowth and dilation of blood vessels, and leukocyte infiltration of dermal and epidermal skin layers. These events appear to be driven, mainly, by various cytokines and chemokines released by activated T cell populations. The aim of this replication study was to determine, whether the rs4649203 SNP of *IL28RA* gene is associated with susceptibility to psoriasis. A total of 341 patients with psoriasis and 407 matched healthy controls were enrolled to carry out a case-

Адрес для переписки:

*Галимова Эльвира Сафуановна
Институт биохимии и генетики Уфимского научного
центра Российской академии наук
450054, Россия, г. Уфа, пр. Октября, 71.
Тел./факс: 8 (3472) 235-60-88.
E-mail: elya-4@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Galimova Elvira S.
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center,
Russian Academy of Sciences
450054, Russian Federation, Ufa, Oktyabrya av., 71.
Phone/Fax: 7 (3472) 235-60-88.
E-mail: elya-4@yandex.ru*

Образец цитирования:

*Э.С. Галимова, Э.К. Хуснутдинова, «Ген рецептора
интерлейкина 28 альфа IL28RA и псориаз: ассоциация
с тяжестью болезни и возрастом манифестации»
// Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 567-572.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-567-572*

© Галимова Э.С., Хуснутдинова Э.К., 2015

For citation:

*E.S. Galimova, E.K., Khusnutdinova, "Interleukin 28 receptor
gene alpha IL28RA and psoriasis: association with disease
severity and age at onset", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 567-572.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-567-572*

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-567-572>

control study. Genotyping was performed using a Real-Time PCR assay. Our preliminary data suggest that the polymorphism located in *IL28RA* gene, known to be related to inflammatory and immunity processes, showed an association with patients' age at onset and the disease severity. The results of this study are promising, with respect to development of a personalized approach to psoriasis treatment.

Key words: genetic association, psoriasis, interferon lambda genes, IFN λ R1, IL28RA gene

Введение

Псориаз — распространенный хронический воспалительный дерматоз, который характеризуется гиперпролиферацией эпидермиса и нарушением кератинизации [1]. Проблема псориаза является одной из актуальных в медицине, поскольку заболевание широко распространено, а методы лечения недостаточно совершенны. Значимым фактором, затрудняющим разработку оптимальных и эффективных методов лечения терапии псориаза, является неясность этиологии и патогенеза заболевания, несмотря на длительную историю изучения дерматоза. Псориаз имеет многофакторную природу, в риск развития и прогрессию которой существенный вклад вносят многие генетические и средовые факторы, а также их взаимодействие [1].

Кожа является основным барьерным органом человека, а также высокоорганизованным периферическим органом иммунной системы, обладающим большим количеством разнообразных иммунокомпетентных клеток. Это позволяет коже осуществлять ряд важных физиологических функций, поддерживающих гомеостаз организма: распознавание антигенного материала, его элиминацию, дифференцировку наивных иммунных клеток в различные эффекторные популяции, иммунологический контроль над опухолевыми клетками. Многие процессы, необходимые для поддержания целостности кожи, в том числе антимикробная/противовирусная защита, заживление ран и противоопухолевый эффект, регулируются цитокинами [2]. В здоровой коже и слизистых оболочках наблюдается сбалансированное содержание про- и противовоспалительных цитокинов, что обеспечивает адекватный иммунный ответ на антигенную стимуляцию. Многочисленные исследования демонстрируют, что IFN λ s (интерфероны лямбда) члены IL-10-IFN семейства цитокинов являются важными регуляторами некоторых из этих процессов [2, 3].

Изменения в генах, кодирующих интерлейкины, имеют большое значение для активации иммунокомпетентных клеток и, следовательно, развития патологических изменений в эпидермисе. Исследованиями установлена роль генетических полиморфизмов и мутаций цитокинов и цитокиновых рецепторов, а также компонентов их сигнальных путей в патогенезе псориаза

[4-8]. К настоящему времени, благодаря использованию подходов анализа сцепления в семьях и полногеномных исследований ассоциаций (GWAS — genome-wide association study) в выборках здоровых и больных, достигнуты определенные успехи в расшифровке молекулярно-генетических механизмов развития псориаза. Одно из последних GWAS выявило, что аллель А полиморфного локуса rs4649203 гена *IL28RA* маркирует повышенный риск развития псориаза в европейских популяциях (OR = 1,13, p = 7 × 10⁻⁸) [9].

Репликативные исследования на независимых выборках позволят существенно сократить число как ложно-положительных, так и ложно-отрицательных результатов, и тем самым подтвердить роль изученных генов в патогенезе многофакторного заболевания. Таким образом, **целью данной работы** является репликативный анализ ассоциаций полиморфного варианта rs4649203 гена *IL28RA* с риском развития псориаза у русских Волго-Уральского региона на независимой выборке.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК 341 больных псориазом, состоящих на учете и находящихся на стационарном лечении в Республиканском кожно-венерологическом диспансере г. Уфа Республики Башкортостан. Выборку больных составили неродственные между собой пациенты в возрасте от 3 до 80 лет русской этнической принадлежности.

Клиническое обследование больных для постановки диагноза проводилось на основе специально разработанной формализованной карты истории болезни, куда включались данные о возрасте, поле, национальности больного, анамнезе заболевания, особенностях течения, наследственности, провоцирующих факторах, ранее проводимом лечении, перенесенных и сопутствующих заболеваниях. Клиническое обследование проведено врачами отделений, которое включало в себя сбор жалоб и анамнеза, физикальные, лабораторные и инструментальные методы диагностики.

В диагностике псориазического артрита использовались критерии CASPAR (Классификация критериев псориазического артрита — ClASsification criteria for Psoriatic ARthritis), рентгенографическое исследование

суставов и позвоночника, а также анализ крови для определения ревматоидного фактора в крови пациента и исключения ревматоидного артрита.

Контрольная группа была сформирована из 407 здоровых неродственных индивидов, соответствующих выборке больных по возрасту, полу и этнической принадлежности (табл. 1). Забор крови производился на станциях переливания крови у здоровых доноров, отрицающих наличие псориаза и других аутоиммунных заболеваний у себя и родственников.

ДНК была выделена из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [10]. Генотипирование выборки больных псориазом и здоровых доноров по полиморфному локусу rs4649203 гена *IL28RA* было проведено методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (РТ-ПЦР) с использованием CFX 96™ Real-Time Cycler (BioRad).

Соответствие наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди-Вайнберга оценивали с помощью точного критерия Фишера [11] в программе FINNETI. Статистическая обработка полученных данных проводилась с использованием пакета прикладных программ PLINK, FINNETI и MS Excel 2013 (Microsoft). При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и здоровых лиц применялся критерий χ^2 , точный критерий Фишера и критерий χ^2 с поправкой Йетса для таблиц сопряженности 2x2. Силу ассоциаций генотипических характеристик с риском развития псориаза

оценивали по значениям показателя отношения шансов (odds ratio, OR).

Результаты и обсуждение

В данной работе был проведен репликативный анализ ассоциации полиморфного варианта rs4649203 гена *IL28RA* с риском развития псориаза у русских Волго-Уральского региона на независимой выборке.

Сравнение распределения частот аллелей и генотипов SNP rs4649203 гена *IL28RA* между группой больных псориазом и контрольной выборкой, с учетом степени тяжести псориаза (легкая и тяжелая) и манифестации болезни (I тип – до 40 лет и II тип – после 40 лет), показало статистически значимые различия ($p < 0,05$) (табл. 1-3).

В общей выборке больных псориазом обнаружена ассоциация аллеля А ($p = 0,00027$, OR = 1,56, 95% CI = 1,23-1,99) и гомозиготного генотипа А/А ($p = 0,0034$, OR = 2,55, 95% CI = 1,34-4,89) rs4649203 гена *IL28RA* с риском развития псориаза (табл. 1). Также нами было установлено, что аллель А rs4649203 гена *IL28RA* ($p = 0,0004$, OR = 1,64, 95% CI = 1,24-2,16), а также гомозиготный генотип А/А и маркируют повышенный риск развития заболевания у больных с легкой степенью тяжести псориаза ($p = 0,0033$, OR = 3,13; 95% CI = 1,41-6,94) (табл. 2). Аллель А и гомозиготный генотип А/А rs4649203 гена *IL28RA* повышают риск развития заболевания как у больных с псориазом I типа (OR = 1,48, 95% CI = 1,13-1,92; OR = 2,15, 95% CI = 1,08-4,28 соответственно), так и II типа (OR = 2,2, 95% CI = 1,30-4,05; OR = 6,1, 95% CI = 0,82-4,51 соответственно), но при этом повышенный риск

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА rs4649203 ГЕНА *IL28RA* У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ В ЦЕЛОМ

rs полиморфный вариант, ген rs4649203, <i>IL28RA</i>	Частота у больных р (%)	Частота у здоровых доноров р (%)	χ^2 (P-value)	^a OR (95%CI)
В целом	N = 341	N = 407		
GG	4,1 (14)	8,59 (35)		1
AG	31,37 (107)	38,57 (157)	2,49 (0,11)	1,70 (0,87-3,32)
AA	64,51 (220)	52,82 (215)	8,54 (0,003)	2,55 (1,34-4,89)
Доминантная форма наследования AA+AG versus GG	95,88 (327) 4,1 (14)	91,39 (372) 8,59 (35)	6,12 (0,01)	2,19 (1,16-4,15)
Рецессивная форма наследования AA versus GG+AG	64,51 (220) 36,47 (121)	52,82 (215) 47,16 (192)	10,42 (0,001)	0,61 (0,45-0,82)
Рисковый аллель А	80,2 (273)	72,1 (293)	13,25 (0,00027)	1,56 (1,23-1,99)

Примечание. N – численности групп, р – частота генотипа (аллеля, модели наследования), χ^2 (р) – оценка достоверности различий по распределению частот генотипов между двумя группами, OR – отношение шансов, 95%CI – доверительный интервал.

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА rs4649203 ГЕНА IL28RA У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С УЧЕТОМ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

rs полиморфный вариант, ген rs4649203, IL28RA	Частота у больных р (%)	Частота у здоровых доноров р (%)	χ^2 (P-value)	^a OR (95%CI)
Легкая степень	N = 236	N = 407		
GG	3,38 (8)	8,59 (35)		1
AG	31,35 (74)	38,57 (157)	3,12 (0,07)	2,06 (0,91-4,66)
AA	65,25 (154)	52,82 (215)	8,64 (0,003)	3,13 (1,41-6,94)
Доминантная форма наследования AA+AG versus GG	96,61 (228) 3,38 (8)	91,39 (372) 8,59 (35)	6,50 (0,01)	2,68 (1,22-5,88)
Рецессивная форма наследования AA versus GG+AG	65,25 (154) 34,75 (82)	52,82 (215) 47,16 (192)	9,44 (0,002)	0,59 (0,42-0,83)
Рисковый аллель А	80,9 (191)	72,1 (293)	12,51 (0,0004)	1,64 (1,24-2,16)
Тяжелая степень	N = 101	N = 407		
GG	5,94 (6)	8,59 (35)		1
AG	31,68 (32)	38,57 (157)	0,13 (0,72)	1,18 (0,46-3,06)
AA	62,37 (63)	52,82 (215)	1,36 (0,24)	1,70 (0,68-4,25)
Доминантная форма наследования AA+AG versus GG	94,06 (95) 5,94 (6)	91,39 (372) 8,59 (35)	0,77 (0,37)	1,49 (0,61-3,64)
Рецессивная форма наследования AA versus GG+AG	62,37 (63) 37,62 (38)	52,82 (215) 47,16 (192)	2,98 (0,08)	0,67 (0,43-1,05)
Рисковый аллель А	43,56 (44)	72,1 (293)	3,08 (0,08)	1,38 (0,96-2,00)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

развития псориаза во втором случае был в разы выше (табл. 3).

При доминантной модели наследования (AA+AG versus GG) носительство рискового аллеля А повышает риск развития болезни у больных псориазом в группе в целом (OR = 2,19, 95%CI = 1,16-4,15) и с легкой степенью заболевания (OR = 2,68, 95%CI = 1,22-5,88), тогда как при рецессивной (AA versus GG +AG) модели наследования носительство рискового аллеля А понижает риск развития болезни у больных псориазом в группе в целом (OR = 0,61, 95%CI = 0,45-0,82) и с легкой степенью тяжести заболевания (OR = 0,59, 95%CI = 0,42-0,83) (табл. 1-3). Таким образом, результаты настоящего репликативного исследования подтверждают данные, полученные в ходе GWAS, которое идентифицировало полиморфный локус rs4649203 гена *IL28RA* как маркер повышенного риска развития псориаза в европейских популяциях [9].

По результатам зарубежных исследований показана роль полиморфных вариантов гена *IL28RA* в патогенезе различных заболеваний, таких как псориаз [9], гепатит С и В [12, 13], системная красная волчанка [14] и аллергический ринит [15]. Ген *IL28RA* кодирует трансмембранный белок, который гетеродимеризуется с другой

субъединицей IL-10RB, связывая интерфероны лямбда IL-28A, IL-28B и IL-29. Ген *IL28RA* локализуется на хромосоме 1p36.11 и имеет семь экзонов. IFN λ s были впервые описаны относительно недавно – в 2003 г. Данное семейство интерферонов включает три белка – IFN λ 1 (IL-29), IFN λ 2 (IL-28A) и IFN λ 3 (IL-28B) [2, 3]. Белки этого семейства имеют структурное сходство с IL-10-подобными цитокинами и интерферонами I типа.

Внутриклеточная передача сигнала IFN λ максимально близка к сигнальной трансдукции IFN α и вызывает экспрессию тех же белков, приводя к аналогичным биологическим эффектам, к которым относятся противовирусное, противовоспалительное и противоопухолевое действия. IFN λ s через рецепторы IFN λ R активируют сигнальные пути JAK-STATs (Янус-киназа, сигнальный трансдуктор и активатор транскрипции) и MAPKs (Митоген-активируемая протеинкиназа), индуцируя противовирусные, противоопухолевые, антипролиферативные и иммунные реакции [2, 3].

IFN α уже нашли применение в клинической практике в качестве иммуномодуляторов при заболеваниях вирусной этиологии. Фармацевтические препараты на их основе используются для лечения ряда инфекционных

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ И ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФНОГО ЛОКУСА rs4649203 ГЕНА *IL28RA* У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С УЧЕТОМ МАНИФЕСТАЦИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

rs полиморфный вариант, ген rs4649203, <i>IL28RA</i>	Частота у больных р (%)	Частота у здоровых доноров р (%)	χ^2 (P-value)	^a OR (95%CI)
Тип I < 40	N = 251	N = 407		
GG	4,78 (12)	8,59 (35)		1
AG	31,87 (80)	38,57 (157)	1,21 (0,27)	1,48 (0,73-3,02)
AA	63,34 (159)	52,82 (215)	4,99 (0,02)	2,15 (1,08-2,28)
Доминантная форма наследования AA+AG versus GG	95,22 (239) 4,78 (12)	91,39 (372) 8,59 (35)	3,41 (0,06)	1,87 (0,95-3,68)
Рецессивная форма наследования AA versus GG+AG	63,35 (159) 36,65 (92)	52,82 (215) 47,16 (192)	7,01 (0,008)	0,64 (0,46-0,89)
Рисковый аллель А	79,2 (198)	72,1 (293)	8,48 (0,0036)	1,48 (1,14-1,92)
Тип II > 40	N = 52	N = 407		
GG	1,92 (1)	8,59 (35)		1
AG	25 (13)	38,57 (157)	1,11 (0,29)	2,89 (0,36-22,89)
AA	73,07 (38)	52,82 (215)	4,05 (0,04)	6,18 (0,82-46,51)
Доминантная форма наследования AA+AG versus GG	98,08 (51) 1,92 (1)	91,39 (372) 8,59 (35)	2,84 (0,091)	4,79 (0,64-35,78)
Рецессивная форма наследования AA versus GG+AG	73,07 (38) 26,92 (14)	52,82 (215) 47,16 (192)	7,64 (0,005)	0,41 (0,21-0,78)
Рисковый аллель А	85,6 (44)	72,1 (293)	8,61 (0,0034)	2,29 (1,30-4,05)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

заболеваний, а также в некоторых протоколах противораковой терапии. Однако широкая распространенность рецепторов к $IFN\alpha$ приводит к многочисленным побочным эффектам, что в определенной степени ограничивает широкое применение интерферонов этого семейства. По-видимому, одним из новых подходов в терапии аутоиммунных, вирусных и онкозаболеваний можно считать создание рекомбинантных препаратов на основе $IFN\lambda$, поскольку внутриклеточная передача сигнала в данном случае практически совпадает с путем сигнальной трансдукции $IFN\alpha$, что приводит к аналогичным биологическим эффектам. Однако глав-

ным преимуществом интерферонов III типа является их таргетное воздействие на клетки иммунной и нервной систем, что может привести к снижению уровня осложнений при их использовании в клинической практике.

Таким образом, *IL28RA* представляет несомненный интерес как ген-кандидат для изучения предрасположенности к псориазу. Понимание генетических механизмов развития заболевания имеет существенное значение для определения подходов к профилактике псориаза в отягощенных семьях, для разработки оптимальных и эффективных методов терапии и персонализированного подхода к лечению.

Список литературы / References

1. Campalani E., Barker J. The clinical genetics of psoriasis. *Current Genomics*, 2005, Vol. 6, pp. 51-60.
2. Chae S.C., Park Y.R., Li C.S., Yang Y.S., Zhang Q., Kim K.S., Chung H.T. Analysis of the variations in *IL-28RA* gene and their association with allergic rhinitis. *Exp. Mol. Med.*, 2006, Vol. 38, pp. 302-309.
3. Fortunato G., Calcagno G., Bresciamorra V., Salvatore E., Filla A., Capone S., Liguori R., Borelli S., Gentile I., Borrelli F., Borgia G., Sacchetti L. Multiple sclerosis and hepatitis C virus infection are associated with single nucleotide polymorphisms in interferon pathway genes. *Journal of Interferon and Cytokine Research.*, 2008, Vol. 28, no. 3, pp. 141-152.
4. Galimova E., Akhmetova V., Latipov B., Kingo K., Rätsep R., Traks T., Kõks S., Khusnutdinova E. Analysis of genetic variants of class II cytokine and their receptor genes in psoriasis patients of two ethnic groups from the Volga-Ural region of Russia. *J. Dermatol. S.*, 2012, Vol. 68, no. 9, pp. 9-18.

5. Gong Q.M., Kong X.F., Yang Z.T., Xu J., Wang L., Li X.H., Jin G.D., Gao J., Zhang D.H., Jiang J.H., Lu Z.M., Zhang X.X. Association study of IFNAR2 and IL10RB genes with the susceptibility and interferon response in HBV infection. *J. Viral Hepat.*, 2009, Vol. 16, pp. 674-680.
6. Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 1992, Vol. 48, pp. 361-372.
7. Kingo K., Kõks S., Silm H., Vasar E. IL-10 promoter polymorphisms influence disease severity and course in psoriasis. *Genes Immun.*, 2003, Vol. 4, no. 6, pp. 455-457.
8. Kingo K., Kõks S., Nikopensius T., Silm H., Vasar E. Polymorphisms in the interleukin-20 gene: relationships to plaque-type psoriasis. *Genes and Immunity*, 2004, Vol. 5, no. 2, pp. 117-121.
9. Kõks S., Kingo K., Rätsep R., Karelson M., Silm H., Vasar E. Combined haplotype analysis of the interleukin-19 and -20 genes: relationship to plaque-type psoriasis. *Genes Immun.*, 2004, Vol. 5, p. 662.
10. Kõks S., Kingo K., Vabrit K., Rätsep R., Karelson M., Silm H., Vasar E. Possible relations between the polymorphisms of the cytokines IL-19, IL-20 and IL-24 and plaque-type psoriasis. *Genes Immun.*, 2005, Vol. 6, p. 407.
11. Kotenko S. V. IFN λ s. *Current Opinion in Immunology*, 2011, Vol. 23, no. 5, pp. 583-590.
12. Li Y., Cheng H., Zuo X. B., Sheng Y.J., Zhou F.S., Tang X.F., Tang H.Y., Gao J.P., Zhang Z., He S.M., Lv Y.M., Zhu K.J., Hu D.Y., Liang B., Zhu J., Zheng X.D., Sun L.D., Yang S., Cui Y., Liu J.J., Zhang X.J. Association analyses identifying two common susceptibility loci shared by psoriasis and systemic lupus erythematosus in the Chinese Han population. *Journal of Medical Genetics*, 2013, Vol. 50, no. 12, pp. 812-818.
13. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. *Methods in Molecular Biology. Human Press.*, 1984, no. 2, pp. 31-34.
14. Strange A., Capon F., Spencer C.C., Knight J., Weale M.E., Allen M.H., Barton A., Band G., Bellenguez C., Bergboer J.G., Blackwell J.M., Bramon E., Bumpstead S.J., Casas J.P., Cork M.J., Corvin A., Deloukas P., Dilthey A., Duncanson A., Edkins S., Estivill X., Fitzgerald O., Freeman C., Giardina E., Gray E., Hofer A., Hüffmeier U., Hunt S.E., Irvine A.D., Jankowski J., Kirby B., Langford C., Lascorz J., Leman J., Leslie S., Mallbris L., Markus H.S., Mathew C.G., McLean W.H., McManus R., Mössner R., Moutsianas L., Naluai A.T., Nestle F.O., Novelli G., Onoufriadis A., Palmer C.N., Perricone C., Pirinen M., Plomin R., Potter S.C., Pujol R.M., Rautanen A., Riveira-Munoz E., Ryan A.W., Salmhofer W., Samuelsson L., Sawcer S.J., Schalkwijk J., Smith C.H., Stähle M., Su Z., Tazi-Ahnini R., Traupe H., Viswanathan A.C., Warren R.B., Weger W., Wolk K., Wood N., Worthington J., Young H.S., Zeeuwen P.L., Hayday A., Burden A.D., Griffiths C.E., Kere J., Reis A., McVean G., Evans D.M., Brown M.A., Barker J.N., Peltonen L., Donnelly P., Trembath R.C. A genome-wide association study identifies new psoriasis susceptibility loci and an interaction between HLA-C and ERAP1. *Nat. Genet.*, 2010, Vol. 42, pp. 985-990.
15. Wolk K., Witte K., Sabat R. Interleukin-28 and interleukin-29: novel regulators of skin biology. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 2010, Vol. 30, no. 8, pp. 617-628.

Авторы:

Галимова Э.С. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека, Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия
Хуснутдинова Э.К. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией молекулярной генетики человека, Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра Российской академии наук, г. Уфа, Россия

Authors:

Galimova E.S., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Human Molecular Genetics, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation
Khusnutdinova E.K., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Human Molecular Genetics, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Scientific Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Поступила 23.07.2015
Отправлена на доработку 21.09.2015
Принята к печати 22.09.2015

Received 23.07.2015
Revision received 21.09.2015
Accepted 22.09.2015

ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ НА ЭТАПЕ ДИАГНОСТИКИ

Исаева Н.В., Зайцева Г.А., Докшина И.А.

ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства, г. Киров, Россия

Резюме. Исследованы параметры иммунного статуса у 140 больных хроническим лимфолейкозом. Показано, что уже на этапе диагностики группа больных хроническим лимфолейкозом является разнородной по состоянию иммунологической защиты, а именно по численности иммунокомпетентных клеток в периферической крови. Трактовка их количественных характеристик по общепринятым правилам в большинстве случаев достаточно затруднительна. Приведены обоснования того, что наиболее информативным параметром клеточного иммунитета может быть число активированных Т-лимфоцитов и НК-клеток. Продвинутость опухолевого процесса имеет тесную ассоциативную связь только с одним из исследованных параметров — с соотношением клеток CD4⁺/CD8⁺.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, Т-лимфоциты, НК-клетки, соотношение CD4⁺/CD8⁺

FEATURES OF IMMUNOCOMPETENT CELLS IN THE PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA AT PRIMARY DIAGNOSIS

Isaeva N.V., Zaitseva G.A., Dokshina I.A.

Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical-Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Abstract. Some basic parameters of immune profile have been investigated in 140 patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). There was shown that the cohort of CLL patients is heterogeneous for their immune profile as early as at primary diagnosis stage, showing sufficient differences in the numbers of immunocompetent cells in peripheral blood. In most cases, the interpretation of appropriate quantitative characteristics is quite difficult, if based on the conventional criteria. The numbers of activated T-lymphocytes and NK-cells were proven to be the most informative parameters of cellular immunity in this cohort. Progression of leukemic events shows a close association with only a single parameter under study, i.e., CD4⁺/CD8⁺ cell ratio.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, T-lymphocytes, NK-cells, proportion CD4⁺/CD8⁺

Адрес для переписки:

*Исаева Наталья Васильевна
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский
институт гематологии и переливания крови»
Федерального медико-биологического агентства
610027, Россия, Киров, Красноармейская ул., 72.
Тел.: 8 (8332) 54-51-83.
Факс: 8 (8332) 54-97-31.
E-mail: isaevanatalia@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Isaeva Natalia V.
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion,
Federal Medical-Biological Agency
610027, Russian Federation, Kirov, Krasnoarmeiskaya str., 72.
Phone: 7 (8332) 54-51-83.
Fax: 7 (8332) 54-97-31.
E-mail: isaevanatalia@yandex.ru*

Образец цитирования:

*Н.В. Исаева, Г.А. Зайцева, И.А. Докшина,
«Характеристики иммунокомпетентных клеток у больных
хроническим лимфолейкозом на этапе диагностики»
// Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 573-578.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-573-578*

© Исаева Н.В. и соавт., 2015

For citation:

*N.V. Isaeva, G.A. Zaitseva, I.A. Dokshina, "Features of
immunocompetent cells in the patients with chronic lymphocytic
leukemia at primary diagnosis", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 573-578.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-573-578*

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-573-578>

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) является неоднородным заболеванием, что подтверждено клиническими, морфологическими и цитогенетическими исследованиями. Больным ХЛЛ уже на донозологических этапах заболевания свойственна повышенная подверженность инфекционно-воспалительным процессам, присоединение аутоиммунных осложнений и недостаточность противоопухолевого иммунитета [1]. Патогенез ХЛЛ до конца не раскрыт. В настоящее время интенсивно изучаются аспекты взаимодействия лейкемических клеток с микроокружением, что обеспечивает их выживание, пролиферацию, резистентность к действию проапоптотических стимулов [2]. Не исключено влияние клеток иммунной системы на разнообразие проявлений лейкозного процесса [3]. Это послужило поводом для проведения настоящего исследования.

Цель работы состояла в изучении информативности принятых характеристик иммунокомпетентных клеток для оценки состояния иммунной защиты больных ХЛЛ на этапе диагностики заболевания, а также в исследовании взаимосвязей этих параметров с некоторыми клинико-лабораторными показателями пациентов.

Материалы и методы

Объект наблюдения

Под наблюдением находилось 140 больных ХЛЛ, их возраст варьировал от 50 до 79 лет. Исследование выполнено в период первичного обращения пациентов, то есть на момент диагностики. Определение стадии заболевания проводилось соответственно классификации J. Vinet. Распределение больных по стадиям было следующим: со стадией А – 72 человека, с В – 60, с С – 8.

В качестве контрольной группы взята когорта из 25 практически здоровых лиц, сопоставимых с наблюдаемыми по возрасту и полу.

Клеточные факторы иммунитета

Материалом для исследования являлись образцы периферической крови, стабилизированные К₃ЭДТА. Иммунологические реакции проводили с трехпараметрическими и двухпараметрическими моноклональными антителами (производство: Франция, «IMMUNOTECH»). Идентифицировали и подсчитывали процент иммунокомпетентных клеток: Т-лимфоцитов (по фенотипу CD3⁺CD19⁻), В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺), Т-хелперов (CD3⁺CD4⁺), Т-цитотоксических (CD3⁺CD8⁺), Т-лимфоцитов с функцией натуральных киллеров, или Т-НК-лимфоцитов (CD3⁺CD(16⁺56⁺)), поздних активированных Т-лимфоцитов (CD3⁺HLA-DR⁺); цитотоксических лимфоцитов, не относящихся к Т-линии и имеющих функции «серийных убийц» (CD3⁻CD8⁺); натуральных киллеров (CD3⁻

CD(16⁺56⁺)). Абсолютное число названных клеток определяли методом пересчета. Вычисляли соотношения клеток: Т-лимфоциты/В-лимфоциты (Т/В) и Т-хелперы/Т-цитотоксические (CD4⁺/CD8⁺). Следует отметить, что метод оценки, используемый нами для определения этих показателей в 2010–2014 годах, проходил внешний контроль качества в Федеральной системе внешней оценки качества.

Общий анализ крови, миелограмма

При анализе результатов исследований учитывались некоторые данные, входящие в план стандартного обследования каждого больного ХЛЛ: параметры общего анализа крови (число лейкоцитов, лимфоцитов, эритроцитов, тромбоцитов, уровень гемоглобина) и миелограммы (клеточность костного мозга и содержание лимфоидных элементов в пунктате).

Статистический анализ. При анализе индивидуальных отклонений изучаемых иммунологических параметров принимали во внимание сдвиги в пределах 1,5 σ от среднего значения, поскольку именно этот диапазон считается наиболее информативным для диагностики иммунодефицитных состояний [4]. Для межгруппового сравнения использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, показатель достоверности р, коэффициент корреляции Спирмена r; оценку различий производили по общепринятому порогу значимости – $p \leq 0,05$.

Описательная статистика представлена медианой (Me), 25 и 75 квартилями (Q₂₅, Q₇₅).

Результаты

Количественные характеристики иммунокомпетентных клеток при ХЛЛ на этапе диагностики

При анализе образцов крови больных ХЛЛ методом проточной цитометрии был локализован лимфоцитарный полигон. Он содержал клетки с низкими значениями гранулярности. В подавляющем большинстве образцов показатели размера клеток были малыми или средними и в очень редких случаях (в 2%) – крупными. Определение их линейной принадлежности показало, что относительное содержание Т- и НК-лимфоцитов значительно варьировало, например, для Т-лимфоцитов диапазон значений составил 0,5–43,0%, а для натуральных киллеров – 0,6–19,3%. На долю В-лимфоцитов (CD3⁻CD19⁺) приходилось 45,1–97% клеток. В отношении результатов исследования всех образцов был применен аналитический внутрилабораторный контроль качества путем подсчета контрольной суммы «Т + В + НК». Для всех без исключения образцов эта контрольная сумма соответствовала рекомендуемому критерию 100±5%.

Соотношение Т/В в наблюдаемой группе больных варьировало от 0,5 до 2,3 и значительно

отклонялось в сторону понижения от такового в группе сравнения: 1,5 (1,1; 1,9) против 4,9 (3,6; 5,6), $p = 0,001$. Детальное изучение В-лимфоцитов показало, что основная их масса имела абберантный фенотип: на поверхности клеток значительно преобладала экспрессия одной из цепей иммуноглобулинов (каппа или лямбда) и наблюдалась выраженная коэкспрессия маркеров CD5, CD23.

В таблице 1 представлены среднестатистические значения процентного и абсолютного числа изученных типов лимфоцитов в общей группе больных ХЛЛ и в группе сравнения.

У больных наблюдается значимое снижение относительного содержания в крови Т-лимфоцитов и их основных субпопуляций (Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов), Т-НК-клеток и поздних активированных Т-лимфоцитов, натуральных киллеров и CD8⁺ лимфоцитов с многократным цитотоксическим действием. Что касается среднестатистических значений абсолютного содержания в крови изученных видов лимфоцитов, то все они, кроме CD3⁺/HLA-DR⁺ лимфоцитов, были существенно выше нормы.

В группе сравнения для каждого абсолютно значения исследуемого показателя мы рассчитали диапазоны значений, соответствующие $M \pm 1,5 SD$. Представляло интерес проанализировать число лимфоидных популяций на индивидуальном уровне в наблюдаемой группе пациентов. Как видно из таблицы 2, среди больных ХЛЛ присутствовали лица как со снижением абсолютной численности Т- и НК-лимфоцитов, так и с нормальным и повышенным числом этих клеток.

Проведен анализ числа лиц с понижением количества лимфоидных иммунокомпетентных клеток. Относительно редко у больных регистри-

ровалось понижение содержания Т-лимфоцитов, Т-хелперов, цитотоксических Т-лимфоцитов и НК-клеток с многократным цитотоксическим эффектом. Наиболее часто выявлялось понижение количества НК, Т-НК-клеток и поздних активированных Т-клеток (ниже 192, 65 и 10 клеток на мкл соответственно).

Только у 15,9% больных соотношение клеток CD4⁺/CD8⁺ укладывалось в принятые нормы. Как видно из таблицы 1, его среднестатистическое значение в наблюдаемой группе больных не отличалось от нормы. Следует добавить, что варьирование этого параметра у больных ХЛЛ было достаточно широким (0,6-3,5).

Выраженное большинство среди больных ХЛЛ на этапе диагностики составляли лица с нормальным или повышенным абсолютным числом иммунокомпетентных клеток. Следует отметить, что у части больных увеличение числа этих клеток было многократным.

Взаимозависимость количественных характеристик Т-лимфоцитов, их субпопуляций и НК-клеток с некоторыми клинико-лабораторными параметрами у больных ХЛЛ

Были проведены расчеты по выявлению закономерностей содержания в крови изучавшихся видов лимфоцитов с клинико-лабораторными данными у больных.

Не установлено значимой связи между названными параметрами и возрастом больных.

Большинство этих показателей, выраженных в процентах, находилось в обратной корреляционной связи с абсолютным содержанием в периферической крови лимфоидных элементов, исключение составило число одной малой популяции Т-лимфоцитов – Т-НК-клеток.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ Т-ЛИМФОЦИТОВ И НК-КЛЕТОК У БОЛЬНЫХ ХЛЛ НА ЭТАПЕ ДИАГНОСТИКИ

Показатели	Группа сравнения Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	Больные ХЛЛ Me (Q ₂₅ ; Q ₇₅)	p
CD3 ⁺ CD19 ⁻ , %	78,5 (71,6; 83,5)	12,8 (8,5; 18,2)	0,000
CD3 ⁺ CD19 ⁻ , клеток в мкл	1460 (1215; 1601)	2626 (1816; 3742)	0,000
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	39,5 (36,9; 48,0)	6,1 (3,3; 9,7)	0,000
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , клеток в мкл	803 (661; 941)	1598 (1135; 2141)	0,000
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	26,3 (23,3; 32,7)	5,1 (3,3; 7,9)	0,000
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , клеток в мкл	513 (358; 689)	944 (583; 1440)	0,002
Т-НК CD3 ⁺ (16 ⁺ 56) ⁺ , %	3,7 (1,8; 7,1)	0,7 (0,3; 1,8)	0,002
Т-НК CD3 ⁺ (16 ⁺ 56) ⁺ , клеток в мкл	71 (29; 151)	208 (73; 347)	0,013
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	1,0 (0,5; 1,4)	0,3 (0,01; 0,8)	0,003
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , клеток в мкл	18 (10,27)	37 (3; 176)	0,198
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	3,6 (3,2; 6,8)	1,0 (0,6; 1,4)	0,000
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , клеток в мкл	86 (58; 142)	169 (112; 322)	0,009
CD3 ⁺ CD(16 ⁺ 56) ⁺ , %	11,5 (9,3; 18,0)	2,6 (1,3; 4,5)	0,000
CD3 ⁺ CD(16 ⁺ 56) ⁺ , клеток в мкл	181 (127; 383)	500 (201; 811)	0,015
Соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,77 (1,27; 1,94)	1,34 (0,82; 2,25)	0,601

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ОТКЛОНЕНИЙ КОЛИЧЕСТВА ПОДВИДОВ Т-ЛИМФОЦИТОВ И НК-КЛЕТОК ОТ ДИАПАЗОНА НОРМЫ

Показатель	Диапазон нормы (клеток в мкл)	Частота, %		
		снижение	соответствует норме	повышение
CD3 ⁺ CD19 ⁻	1260-1620	6,7	8,9	84,4
CD3 ⁺ CD4 ⁺	720-897	6,7	15,6	77,7
CD3 ⁺ CD8 ⁺	460-690	15,6	17,8	66,6
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,42-1,83	47,7	15,9	36,4
CD3 ⁺ CD8 ⁺	77-13	15,4	23,1	61,5
CD3 ⁺ CD(16 ⁺ 56) ⁺	192-340	22,2	17,8	60,0
CD3 ⁺ (16 ⁺ 56) ⁺	65-123	22,2	11,2	66,6
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺	10-36	40,8	6,8	52,4

Найдена статистически значимая прямая корреляционная связь между абсолютным содержанием клеток с фенотипами CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD(16⁺56)⁺, CD3⁺CD8⁺ с одной стороны и общим и В-клеточным лимфоцитозом крови с другой. Только абсолютные значения поздних активированных Т-лимфоцитов (фенотип: CD3⁺HLA-DR⁺) и НК-клеток (фенотип: CD3⁺CD(16⁺56)⁺) оказались не связанными с абсолютным лимфоцитозом.

Было обнаружено, что у больных с большей выраженностью общего и В-клеточного лимфоцитоза крови регистрируются более низкие значения соотношения клеток CD4⁺/CD8⁺ (существенная отрицательная корреляционная связь: $r = -0,38$, $p < 0,01$).

Абсолютные значения CD3⁺CD19⁻, CD3⁺CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов находились в прямой корреляционной связи с уровнем лимфоцитарной инфильтрации костного мозга. Для других подвидов изученных нами Т-лимфоцитов и НК-клеток такой связи не было установлено.

Проанализировали корреляционную связь между числом изучаемых видов лимфоцитов в крови у больных ХЛЛ и содержанием тромбоцитов и эритроцитов. Из всех показателей зна-

чимая прямая корреляционная зависимость была выявлена для соотношения клеток CD4⁺/CD8⁺ как с содержанием тромбоцитов в крови ($r = 0,35$, $p < 0,05$), так и с количеством эритроцитов ($r = 0,32$, $p < 0,05$).

Интегральным показателем состояния опухолевого процесса является его стадия. В основе стадирования лежит оценка уровня лейкоцитоза, лимфоцитоза, размеров лимфатических узлов, наличия цитопений [5]. Исследование изучаемых параметров у больных в зависимости от стадии заболевания показало, что значимое отличие в группах больных в сравнении с нормой было выявлено только по соотношению CD4⁺/CD8⁺. У больных со стадией А оно было выше нормы, на стадии В совпадало с нормативным значением, а на стадии С оказалось существенно более низким (рис. 1).

Обсуждение

Получены удовлетворительные результаты по аналитическому внутрилабораторному контролю качества лабораторного исследования основных популяций лимфоцитов в крови больных ХЛЛ [6]. Следовательно, при работе с образцами крови этих больных стандартная методика идентификации и подсчета процента Т-, В- и НК-лимфоцитов в проточной цитофлуориметрии является точной и вполне применимой (адекватны методы лизирования эритроцитов, гейтирования лимфоидной популяции, выбора моноклональных антител).

Поскольку CD3⁺CD19⁺ лимфоциты при ХЛЛ имеют абберантный фенотип, то количество этих клеток у больных не может расцениваться как характеристика гуморального звена иммунитета. По этой же причине расчетный параметр «соотношение Т/В» не рекомендуется рассматривать как показатель преобладания клеточных или гуморальных иммунных реакций организма больного. Возможный подход к оценке неопухолевых

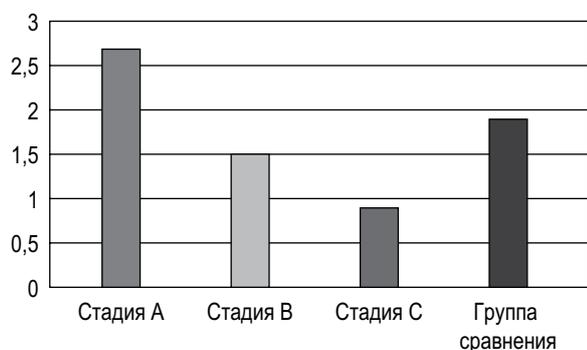


Рисунок 1. Соотношение CD4⁺/CD8⁺ при разных стадиях ХЛЛ

В-лимфоцитов при ХЛЛ был ранее сообщен в литературе [7]. При этом обращено внимание на то, что при его применении результаты имеют весьма приблизительный характер. Следовательно, метод оценки гуморального звена иммунитета при ХЛЛ требует дальнейшей разработки.

Преобладающие в периферической крови опухолевые В-лимфоциты не отличаются от не-трансформированных лимфоцитов ни по морфологическим, ни по цитометрическим характеристикам. Поэтому существенное снижение в крови процентного содержания Т-лимфоцитов, их субпопуляций, НК-клеток при ХЛЛ является вполне ожидаемым результатом. Представленные данные убеждают в том, что для избежания ложных интерпретаций иммунограммы у больных ХЛЛ на этапе диагностики целесообразно опираться на процентные значения содержания Т-лимфоцитов, их субпопуляций, подвидов и НК-клеток. Такой же подход может применяться при оценке иммунокомпетентных клеток у больных ХЛЛ в рецидиве заболевания, а также у больных В-клеточными хроническими лимфопролиферативными заболеваниями в стадии лейкемизации. Требуется дальнейшее совершенствование лабораторных методов прицельного анализа состояния иммунокомпетентных клеток у больных ХЛЛ. Примером такого подхода может служить метод оценки интерферон-гамма-секретирующих Т-лимфоцитов непосредственно в крови этих больных [8].

Число больных ХЛЛ с пониженным абсолютным содержанием Т- и НК-лимфоидных популяций составляет выраженное меньшинство. Учитывая функциональную значимость названных клеток, именно эти лица в первую очередь могут рассматриваться как группа риска по присоединению инфекционных осложнений, снижению противоопухолевой защиты и прогрессированию заболевания.

Увеличение числа Т-лимфоцитов, их субпопуляций и подвидов, НК-клеток при рассматриваемом заболевании может быть связано с угнетением в этих клетках механизмов апоптоза. Другая возможная причина наблюдаемого яв-

ления состоит в усилении сигналов пролиферации, поступающих от опухолевых клеток. Известно, что опухолевые клетки способны дополнительно синтезировать цитокины, усиливающие пролиферацию Т-лимфоцитов и НК-клеток, в первую очередь – IL-6, IL-7, IL-10, IFN γ [9]. Кроме того, нарастание числа Т- и НК-клеток возможно за счет паракринных регулирующих реакций. Согласно полученным данным, сигналы усиления пролиферации в меньшей степени затрагивают НК-клетки. Численность поздних активированных Т-лимфоцитов в периферической крови тоже не связана с опухолевой массой.

Интерпретация результатов исследования у лиц с нормальным и повышенным числом указанных видов лимфоцитов не эффективна, поэтому необходим поиск информативных тестов оценки функциональной активности иммунокомпетентных клеток. Работы экспериментального характера показали, что клеткам ХЛЛ присущи признаки иммуногенности [10]. В то же время имеются сообщения о том, что иммунная недостаточность базируется на функциональной неполноценности названных клеток [11-14]. Следовательно, нельзя исключать присутствие лиц с иммунной недостаточностью и среди больных ХЛЛ с нормальным и повышенным числом иммунокомпетентных клеток.

Наличие корреляционных взаимосвязей количественных характеристик Т- и НК-лимфоцитов, а также соотношения клеток CD4⁺/CD8⁺ с клинико-лабораторными параметрами больных ХЛЛ уже в дебюте заболевания говорит о значимости иммунологических механизмов для характера течения ХЛЛ. Несмотря на отсутствие выраженных взаимосвязей изученных показателей непосредственно с уровнем лимфоцитарной инфильтрации костного мозга, вполне очевидно, что развитие эритроцитопении и тромбоцитопении у больных ХЛЛ сопряжено с нарушением иммунорегуляции, а именно выраженность цитопений сопровождается снижением соотношения клеток CD4⁺/CD8⁺. Только для этого показателя была подтверждена тесная ассоциативная связь с факторами продвинутой опухолевой процессу.

Список литературы / References

1. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2001. 576 с. [Volkova M.A. Clinical oncohematology]. Moscow: Medicine, 2001. 576 p.
2. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. М.: Ньюдиамед, 2002. 280 с. [Vorobiev A.I. Manual of Hematology]. Moscow: Newdiamed, 2002. 280 p.
3. Исаева Н.В., Зайцева Г.А., Загоскина Т.П., Йовдий А.В. Способ определения интерферон-гамма-продуцирующих Т-лимфоцитов при хроническом лимфолейкозе. Патент 2526797. – Российская Федерация, 20.08.14. – бюллетень. № 24. [Isaeva N.V., Zaitseva G.A., Zagoskina T.P., Yovdy A.V. Method for determination of interferon-gamma producing T-lymphocytes in chronic lymphocytic leukemia]. Patent 2526797, Russian Federation, bull. № 24.

4. Караулов А.В. Клиническая иммунология и аллергология. М.: Медицинское информационное агентство, 2002. 651 с. [Karaulov A.V. Clinical immunology and allergology]. Moscow: Medical News Agency, 2002. 651 p.

5. Селиванова Е.И., Виноградова Ю.Е., Замулаева И.А., Саенко А.С. Индивидуальная вариабельность и клиническое значение плотности иммунофенотипических маркеров В-клеточного хронического лимфолейкоза // Гематология и трансфузиология, 2005. Т. 50, № 3. С. 25-28. [Selivanova E.L., Vinogradova Yu.E., Zamulaeva I.A., Saenko A.S. Individual variability and clinical significance of the count of immunophenotypical markers on the cells of B-cell chronic lymphoid leukemia. *Gematologiya i transfuziologiya = Hematology and Transfusiology*, 2005, Vol. 50, no. 3, pp. 25-28. (In Russ.)]

6. Хайдуков С.В., Байдун Л.В., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 974-992. [Khaydukov S.V., Baydun L.V., Zurochka A.V., Totolyan Areg A. The standardised technigie: «Study subpopulations of peripheral blood lymphocytes by using flow cytometry. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 8, no. 4, pp. 974-992. (In Russ.)]

7. Burger J. A., Gandhi V. The lymphatic tissue microenvironments in chronic lymphocytic leukemia: in vitro models and the significance of CD40-CD154 interactions. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 12, pp. 2549-2561.

8. Christopoulos P., Pfeifer D., Bartholomé K., Follo M., Timmer J., Fisch P., Veelken H. – aff-5 Definition and characterization of the systemic T-cell dysregulation in untreated indolent B-cell lymphoma and very early CLL. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 14, pp. 3836-3846.

9. Dianzani U., Omede P., Marmont F., DiFranco D., Fusaro A., Bragardo M., Redoglia V., Giarretta F., Mairone L., Boccadoro M. Expansion of T cells expressing low CD4 or CD8 levels in B-cell chronic lymphocytic leukemia: correlation with disease status and neoplastic phenotype. *Blood*, 1994, Vol. 83, no. 8, pp. 2198-2205.

10. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris-Cappio F., Dighiero G., Dohner H., Hillmen P., Keating M.J., Montserrat E., Rai K.R., Kipps T.J. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008, Vol. 111, no. 12, pp. 5446-5456.

11. Mayr C., Bund D., Schlee M., Moosmann A., Kofler D.M., Hallek M., Wendtner C.-M. Fibromodulin as a novel tumor-associated antigen (TAA) in chronic lymphocytic leukemia (CLL), which allows expansion of specific CD8+ autologous T lymphocytes. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 4, pp. 1566-1573.

12. Riches J.C., Davies J.K., McClanahan F., Fatah R., Iqbal S., Agrawal S., Ramsay A.G., Gribben J.G. T cells from CLL patients exhibit features of T-cell exhaustion but retain capacity for cytokine production. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 9, pp. 1612-1621.

13. Terstappen L.W. M. M., Grooth B. G. De, van Berkel W., Napel C. H. H. Ten, Greve J. Abnormal distribution of CD8 subpopulation in B-chronic lymphocytic leukemia identified by flow cytometry. *Leukemia Research*, 1988, Vol. 12, no. 7, pp. 551-557.

14. Totterman T.H., Carlsson M., Simonsson B., Bengtsson M., Nilsson K. T-cell activation and subset patterns are altered in B-CLL and correlate with the stage of the disease. *Blood*, 1989, Vol. 74, no. 2, pp. 786-792.

Авторы:

Исаева Н.В. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногематологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства, г. Киров, Россия

Зайцева Г.А. – д.м.н., профессор, руководитель научного направления ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства, г. Киров, Россия

Докишина И.А. – к.м.н., старший научный сотрудник гематологической клиники института ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови» Федерального медико-биологического агентства, г. Киров, Россия

Authors:

Isaeva N.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunohematology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Zaitseva G.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Dokshina I.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, The Hematology Clinics, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Federal Medical Biological Agency, Kirov, Russian Federation

Поступила 27.03.2015
Принята к печати 04.04.2015

Received 27.03.2015
Accepted 04.04.2015

ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ МИЕЛОМНОЙ БОЛЕЗНЬЮ G-ФОРМЫ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Смирнова О.В., Манчук В.Т., Агилова Ю.Н.

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

Резюме. Целью работы явилось изучение особенностей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови больных ММ G-формы, в зависимости от стадии заболевания. При этом оценивались следующие параметры: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции, максимальное значение интенсивности хемилюминесценции, площадь кривой хемилюминесценции. Для усиления «респираторного взрыва» добавляли люминол, а индуктором служил зимозан. Усиление хемилюминесценции оценивали по соотношению площади индуцированной к площади спонтанной хемилюминесценции и обозначали индексом активации. Возникновение и прогрессирование ММ в организме человека сопровождается нарушением функциональных свойств нейтрофилов. У больных ММ на II и III стадии достоверно выше показатели спонтанной продукции АФК относительно контроля. Индуцируемая продукция АФК нейтрофилами также повышается во всех исследуемых группах относительно спонтанной продукции и контрольных параметров, что доказывает роль нейтрофильных гранулоцитов не только как клеток первой линии неспецифической противомикробной защиты, но и как цитотоксических эффекторов на опухолевые клетки.

Ключевые слова: множественная миелома, нейтрофильные гранулоциты, хемилюминесценция

CHARACTERISTICS OF NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE IN PATIENTS WITH TYPE G MULTIPLE MYELOMA AT DIFFERENT STAGES OF THE DISEASE

Smirnova O.V., Manchuk V.T., Agilova Yu.N.

Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. The aim of present work was to study some activation features of neutrophilic granulocytes from peripheral blood of the patients with G type of multiple myeloma (MM), as depending on clinical

Адрес для переписки:

Смирнова Ольга Валентиновна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера» СО РАМН
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Address for correspondence:

Smirnova Olga V.
Research Institute for Medical Problems of the North, Siberian
Branch, Russian Academy of Medical Sciences
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partizan
Zhelesnyak str., 3g.
Phone: 7 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Образец цитирования:

О.В. Смирнова, В.Т. Манчук, Ю.Н. Агилова, «Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных миеломной болезнью G-формы в зависимости от стадии заболевания» // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 579-584.
doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-579-584

For citation:

O.V. Smirnova, V.T. Manchuk, Yu.N. Agilova, "Characteristics of neutrophil chemiluminescence in patients with type G multiple myeloma at different stages of the disease", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 579-584. doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-579-584

stage of the disorder. In this study, a number of parameters were evaluated, as follows: time dynamics of the up-to-maximum luminescence increase; maximal luminescence levels, areas under the curves (AUC) for the dynamic luminescence registration. Zymosan was used as chemiluminescence inducer, and luminol, as enhancer of the “respiratory burst”. The chemiluminescence enhancement was assessed as a ratio of AUC values corresponding to induced-to-spontaneous chemiluminescence being denoted as an ‘activation index’. The onset and progression of MM in humans was accompanied by disturbance of neutrophil functions. MM patients at stage II and III exhibited a significant increase of spontaneous ROS production relative to controls. The inducible ROS production by neutrophils was also increased in all groups, as compared with spontaneous production and control parameters, thus arguing for a distinct role of neutrophils, as potentially cytotoxic effectors against tumor cells, along with their basic function of nonspecific antimicrobial protection.

Keywords: multiple myeloma, neutrophilic granulocytes, chemiluminescence

Введение

Множественная миелома (ММ) – хронический гемобластоз, субстратом которого являются атипичные плазматические клетки, синтезирующие парапротеин. В зависимости от класса производимого иммуноглобулина ММ делятся на G-миеломы (55-65% всех миелом), А-миеломы (20-25%), D-миеломы (2-5%), Е-миеломы и М-миеломы (0,5% случаев) [1]. ММ поражает чаще людей в пожилом возрасте, составляет 10% среди всех гемобластозов. Болезнь регистрируется во всех странах мира у людей всех рас, при этом частота ММ составляет в среднем 1,2-3,2 случая на 100 тысяч населения в год [1, 5].

В патогенезе ММ G-формы наблюдается бесконтрольный синтез моноклонального парапротеина класса IgG, который инфильтрирует красный костный мозг, костную ткань, почки, формируя клиническую картину распространенного заболевания.

В последние годы наблюдается тенденция к увеличению случаев заболеваний ММ, а также наблюдается абсолютный рост госпитализаций [6]. Одним из факторов, обуславливающим развитие онкологического заболевания, является снижение реактивности иммунной системы. Иммунодефицитное состояние организма определяет развитие злокачественной опухоли, при этом сама опухоль способствует развитию и пролонгации иммунной супрессии [2]. Нейтрофильные гранулоциты занимают одну из наиболее важных позиций в гуморально-клеточном иммунитете. Являясь клетками первой линии неспецифической противомикробной защиты, активно

участвуют в воспалении, являясь не только фагоцитами, но и эффекторами каскадных реакций, обеспечивающих развитие воспаления, обладают цитотоксическим действием на опухолевые клетки, способствуя противоопухолевой резистентности организма. Особенности функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов влияют на иммунологическую защиту организма в целом. При гемобластозах наблюдаются нарушения в системе клеточно-гуморального иммунитета [3, 4], способствующие возникновению и развитию инфекционных осложнений. При ММ инфекционные заболевания занимают второе место и встречаются у большинства больных. В связи с этим **целью нашей работы** явилось изучение особенностей функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов крови больных ММ G-формы, в зависимости от стадии развития заболевания.

Материалы и методы

Отбор больных для исследования осуществлялся методом случайной выборки по мере госпитализации в гематологическое отделение Краевой клинической больницы № 1 г. Красноярска в период с 2011 по 2012 г. При поступлении врачами гематологами у больных собирался анамнез и анализировались данные объективно-го осмотра, отражающие их общее состояние.

Больных ММ дифференцировали по стадиям заболевания согласно Международной классификации – International Staging System (ISS) (2005 г.). Данная классификация основана на линейной зависимости между содержа-

нием М-белка и клеточной опухолевой массой у больных. При ММ II стадии происходит нарастание массы опухоли, характерны следующие показатели: уровень гемоглобина (Hb) – 85-100 г/л, IgG – 50-70 г/л. При ММ III стадии наблюдается увеличение массы опухоли, характерны гиперкальциемия, остеолитические процессы и следующие показатели: Hb < 85 г/л, IgG > 70 г/л.

Среди 100 обследованных больных ММ – мужчин 38%, женщин 62%. Средний возраст мужчин составлял 60 лет ±2,3 года (от 47 до 73 лет), женщин – 61 год ±3,7 года (от 43 до 76 лет). У 85% человек регистрировались те или иные инфекционные осложнения при поступлении.

Контрольную группу составили 100 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группой обследованных больных. Всем больным венозная кровь бралась

утром натощак из локтевой вены в пробирки с гепарином, при поступлении в стационар, до назначения патогенетической терапии.

Обследование больных и практически здоровых добровольцев проводилось с разрешения этического комитета ФГБУ «НИИ медицинских проблем Севера» СО РАМН, при этом каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование.

В качестве метода изучения использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции активных форм кислорода (АФК) нейтрофильными гранулоцитами больных ММ в зависимости от стадии заболевания (De Sole P. et al., 1983). Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL 3606» (Россия). Регистрация результатов и управление анализатором

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ММ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Показатели	Контроль, N = 118 (1)		Стадия II, N = 65 (2)		Стадия III, N = 35 (3)	
	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅	Me	Q ₂₅ -Q ₇₅
Tmax спонтанная	975	211-1510	884	564-1366	752	444-1374
Imax спонтанная	7720	3000-19000	23270	7630-53232	26500	1572-51480
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,021	
Sqr спонтанная (*10 ⁶)	0,22	0,15-0,54	3,2	0,37-6,1	2,3	0,14-3,7
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
Tmax индуцированная	1102,5	872-1800	1060	733-1819	1020	769-1407
Imax индуцированная	17270	8000-42840	56584	23973-99928	49312	915-102201
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,001	
Sqr индуцированная (*10 ⁶)	0,4	0,15-0,95	7,17	1,2-10,6	5,4	0,11-8,09
			p ₁ < 0,001		p ₁ < 0,003	
Индекс активации	1,3	0,9-2,0	2	3-1	2	1,2-2
			p ₁ < 0,007			

Примечание. p₁ – статистически достоверные различия с величиной контрольных показателей; p₂ – --/- с величиной показателей больных ММ.

осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции (T_{max}), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (I_{max}), площадь кривой хемилюминесценции (S). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированный зимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном, оценивали по соотношению площади индуцированной ($S_{инд}$) к площади спонтанной ($S_{спонт}$) хемилюминесценции и обозначали индексом активации. По результатам проведенных исследований в пакете электронных таблиц MS Excel была сформирована база данных, на основе которой с помощью прикладных программ Statistica 8,0 производился статистический анализ. Вычислялись медиана (Me) и перцентили (Q_{25} - Q_{75}). Статистическую достоверность выборок производили с помощью критериев Манна–Уитни. Различия между группами считались статистически значимыми при $p < 0,05$ [5]. Результаты статистической обработки сведены в таблице 1.

Результаты и обсуждение

Люминол-зависимая хемилюминесценция формируется в системе миелопероксидазы и отражает суммарную активность кислородных и других радикалов.

Хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, показал, что на II и III стадии у больных ММ отмечается увеличение интенсивности хемилюминесценции приблизительно в 3,01 раза на II стадии и в 3,43 раза при III стадии заболевания по сравнению с контролем. Площадь кривой спонтанной хемилюминесценции у больных ММ увеличивалась в 14,54 раза на II стадии и в 10,45 раза на III стадии относительно контроля. При этом не было достоверных изменений в функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов на II и III стадии заболевания. Особенности спонтанной хемилюминесцентной активности

нейтрофильных гранулоцитов при ММ, вероятно, обусловлены наличием злокачественного онкологического заболевания и инфекционными осложнениями, которые регистрировались у большинства больных.

После индукции хемилюминесцентного ответа опсонизированным зимозаном у больных ММ отмечалось увеличение интенсивности хемилюминесценции в 3,28 раза на II стадии, в 2,85 раза на III стадии относительно контроля, при этом в сравнении со спонтанной хемилюминесценцией регистрировалось усиление «свечения» в 2,43 раза на II стадии, и в 1,86 раза на III стадии. Площадь кривой индуцированной хемилюминесценции увеличивалась в 17,95 раза на II стадии и в 13,5 раза на III стадии по сравнению с контрольной группой. При этом в сравнении со спонтанной хемилюминесценцией площадь кривой индуцированной хемилюминесценции увеличивалась в 2,24 раза на II стадии и в 2,34 раза на III стадии.

Индекс активации у больных ММ при II стадии заболевания увеличивался в 1,54 раза относительно контрольной группы, что свидетельствует о несбалансированной работе нейтрофильных гранулоцитов.

Тем не менее хемилюминесцентный анализ функциональной активности нейтрофильных гранулоцитов, характеризующий уровень продукции первичных и вторичных АФК у больных ММ, не показал достоверного изменения времени выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции на II и III стадии заболевания относительно контроля.

Таким образом, на II стадии заболевания достоверно повышались показатели времени выхода кривой на максимум интенсивности и площади кривой при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции и индекс активации по сравнению с контролем.

На III стадии заболевания выявляемые изменения были аналогичны, за исключением особенностей индекса активации.

При оценке неспецифического звена иммунитета у больных на II стадии ММ с инфекционными осложнениями происходят однонаправленные механизмы активации НГ. Статистически

значимо повышались показатели хемилюминесцентной активности как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции — интенсивность хемилюминесценции, площадь кривой, а также индекс активации ($p < 0,045$). Увеличенная индуцированная хемилюминесцентная активность обусловлена активным участием фагоцитов в противоопухолевой и противобактериальной защитах организма. На III стадии ММ происходят разнонаправленные механизмы активации НГ. Статистически значимо повышались показатели как при спонтанной, так и при индуцированной хемилюминесценции — интенсивность хемилюминесценции ($p < 0,05$), площадь кривой ($p < 0,45$), а также индекс активации ($p < 0,45$), но показатели индуцированной хемилюминесценции НГ были статистически значимо ниже, чем при спонтанной ($p < 0,05$).

Заключение

Проведенные исследования показали, что развитие ММ в организме человека сопровождается изменением функциональных свойств периферических нейтрофильных гранулоцитов. По мере прогрессирования заболевания наблюдается увеличение спонтанной продукции АФК нейтрофилами. Так показатели спонтанной продукции АФК у больных ММ на II и III стадии достоверно выше показателей контрольной группы. Индуцируемая продукция АФК нейтрофилами повышается во всех исследуемых группах относительно спонтанной продукции и контрольных параметров, что доказывает роль нейтрофильных гранулоцитов не только как клеток первой линии неспецифической противомикробной защиты, но и как цитотоксических эффекторов на опухолевые клетки.

Список литературы / References

1. Воробьев А.И. Руководство по гематологии. М.: Медицина, 1985. 448 с. [Vorobiev A.I. Manual of Hematology]. Moscow: Medicine, 1985. 448 p.
2. Галактионов В.Г. Иммунология. М.: Изд-во МГУ, 1998. 458 с. [Galaktionov V.G. Immunology]. Moscow: Moscow State University Press, 1998. 458 p.
3. Смирнова О.В., Савченко А.А., Манчук В.Т. Хронические лейкозы клинические и иммунологические особенности возникновения и развития. Новосибирск: ГУП Академический научно-издательский производственно-полиграфический и книгораспространительский центр РАН "Издательство "Наука" Обособленное подразделение «Сибирская издательская фирма "Наука"», 2012. 127 с. [Smirnova O.V., Savchenko A.A., Manchuk V.T. Chronic leukemia clinical and immunological features of the emergence and development.] Novosibirsk: SUE Academic Scientific Publishing and printing production and Bookselling Center RAS "Publisher" Science "Separated subdivision" Siberian Publishing House «Nauka», 2012. 127 p.
4. Смирнова О.В., Титова Н.М., Елманова Н.Г. Роль прооксидантной системы в прогрессировании миеломной болезни // Врач-аспирант, 2013. Т. 60, № 5.1. С. 152-157. [Smirnova O.V., Titova N.M., Elmanova N.G. Prooxidant role in the progression of multiple myeloma. *Vrach-aspirant = Doctor-graduate Student*, 2013, Vol. 60, no. 5.1, pp. 152-157. (In Russ.)]
5. Статистика и проблемы гемобластозов / Василевский М.Г., Камарли З.П. // Вестник Кыргызско-Российского Славянского университета, Кыргызско-Российский Славянский университет, 2007. Т. 7, № 9. С. 84-89. [Statistics problems and Leukemia / Vasilevsky M.G., Kamarli Z.P. *Vestnik Kyrgyzsko-Rossyskogo Slavyanskogo universiteta. Kyrgyzsko-Rossiyskiy Slavyanskiy universitet = Bulletin of the Kyrgyz-Russian Slavic University, Kyrgyzko-Russian Slavic University*, 2007, Vol. 7, no. 9, pp. 84-89. (In Russ.)]

6. Федоров Г.Н., Леонов С.Д. Особенности хемилюминесценции цельной разведенной крови // Математическая морфология. Электронный математический и медико-биологический журнал, 2007. Т. 6, вып. 4. [Fedorov G.N., Leonov S.D. Features chemiluminescence whole diluted blood. *Matematicheskaya morfologiya. Elektronnyy matematicheskiy i mediko-biologicheskiy zhurnal = Mathematical Morphology. Electronic Mathematical and Biomedical Journal*, 2007, Vol. 6, iss. 4. (In Russ.)]

Авторы:

Смирнова О.В. — д.м.н., руководитель лаборатории клинической патофизиологии и аллергологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

Манчук В.Т. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Агилова Ю.Н. — аспирант, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАМН, г. Красноярск, Россия

Authors:

Smirnova O.V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Clinical Pathophysiology and Allergy, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Manchuk V.T., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director for Research, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Agilova Yu.N., Postgraduate Student, Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 03.10.2015
Отправлена на доработку 19.03.2015
Принята к печати 27.03.2015

Received 03.10.2015
Revision received 19.03.2015
Accepted 27.03.2015

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://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе «**О Журнале**».

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» – индекс 83030; Каталог «Пресса России» – индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Агилова Ю.Н.	579	Манчук В.Т.	579
Алекберзаде А.В.	561	Меледина И.В.	539
Бадалов Д.А.	561	Огнева О.И.	517
Борисов А.Г.	525	Осиков М.В.	517
Быкова Н.А.	499	Останин А.А.	539
Вдовин А.С.	499	Савченко А.А.	525
Галимова Э.С.	567	Савченко В.Г.	499
Гизингер О.А.	517	Сазонова О.В.	553
Григорьев А.А.	499	Серебрякова М.К.	525
Докшина И.А.	573	Смирнова О.В.	579
Ефимов Г.А.	499	Старостина Н.М.	539
Зайцева Г.А.	573	Филькин С.Ю.	499
Исаева Н.В.	573	Хуснутдинова Э.К.	567
Калиновская Н.Ю.	553	Черных Е.Р.	539
Кробинец И.И.	525	Шевела Е.Я.	539
Кудрявцев И.В.	525	Шипунов М.В.	539
Леплина О.Ю.	539	Ширинский В.С.	553
Липницкий Е.М.	561	Ширинский И.В.	553

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адеметионин	554	РТПХ	499
аллореактивность	499	С-реактивный белок	561
ассоциация	567	сахарный диабет	554
врожденный и адаптивный иммунитет	517	соотношение CD4 ⁺ /CD8 ⁺	573
генетика	567	субпопуляции цитотоксических Т-лимфоцитов	526
гены интерферонов лямбда	567	Т-лимфоциты	573
десинхронизация	517	трансплантация костного мозга	499
иммунная система	554	хемилюминесценция	579
иммунобиология	499	хемокины	539
клетки крови	539	холецистэктомия	561
лапароскопия	561	хронический лимфолейкоз	573
мелатонин	517	цирроз печени	539
метилирование ДНК	554	цитокины	517, 539
многоцветный анализ	526	α-1-антитрипсин	561
множественная миелома	579	CD27 и CD28	526
молекулярные механизмы	499	CD45RA и CD62L	526
мультиплексный анализ	539	IFNλR1	567
нейтрофильные гранулоциты	579	IL-1β	561
остеоартрит	554	IL28RA	567
проточная цитометрия	526	NK-клетки	573
псориаз	567	TNFα	561
ростовые факторы	539		
РТПО	499		

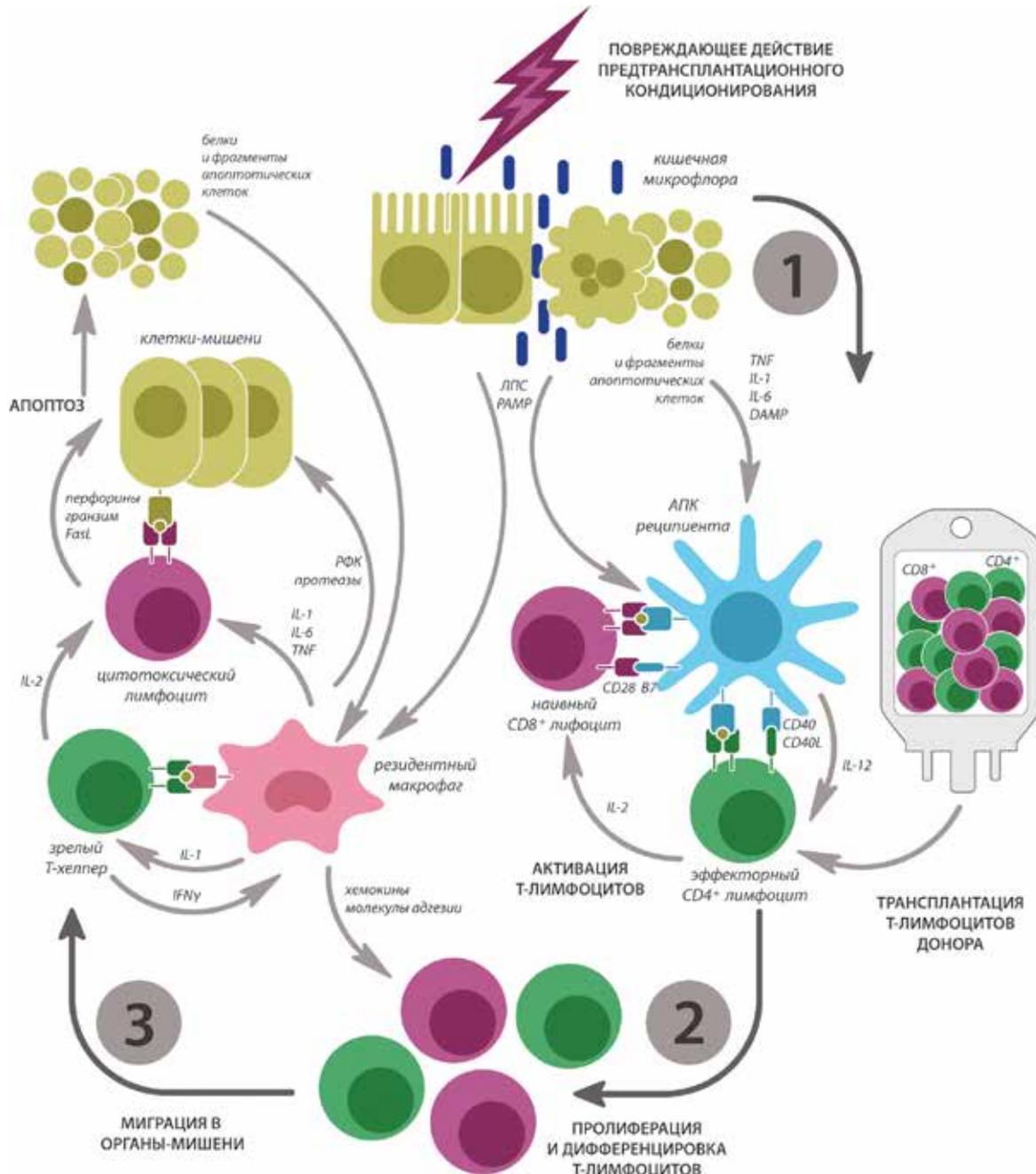


Рисунок 3. Основные стадии развития ОРТПХ

Примечание. (1) На первом этапе в результате предтрансплантационного кондиционирования, включающего в себя различные варианты сочетания лучевой терапии и цитостатических препаратов, происходит повреждение тканей донора. В частности, происходит апоптоз клеток эпителия кишечника, что приводит к высвобождению клеточных компонентов (молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением, Damage-associated molecular patterns – DAMP, АТФ, белки теплового шока, митохондри), распознаваемых клетками врожденного иммунитета. Кроме того, нарушение целостности кишечного эпителия способствует проникновению кишечной микрофлоры и ее продуктов (липолисахарид, неметилованные CpG сайты и другие структуры, называемые патоген-ассоциированными молекулярными паттернами, pathogen-associated molecular patterns – PAMP. В результате активируется секреция провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF) и хемокинов собственно поврежденными эпителиальными клетками и резидентными макрофагами. В провоспалительном микроокружении происходит активация перенесших кондиционирование антигенпрезентирующих клеток пациента, при этом в них повышается экспрессия молекул МНС, рецепторов хемокинов и молекул адгезии, активируется продукция цитокинов, запускается их миграция во вторичные лимфоидные органы. (2) Второй этап развития ОРТПХ происходит после трансфузии кроветворных клеток. Во вторичных лимфоидных органах запускается активация наивных Т-клеток реципиента, специфичных к аллогенным HLA-аллелям или минорным антигенам гистосовместимости. В связи с повсеместной экспрессией аллоантигенов и большим числом аллореактивных клонов презентация антигена не ограничена лимфоидными органами. АПК несут на своей поверхности МНС обоих классов и способны активировать как CD4+, так и CD8+ лимфоциты. Активация Т-клеток вызывает их дифференцировку и клональную пролиферацию, происходит экспансия аллореактивных клонов. Важная роль на этом этапе отводится CD4+ лимфоцитам, которые дополнительно стимулируют АПК через взаимодействие CD40/CD40L, при этом повышается экспрессия костимуляторных молекул, что необходимо для эффективной активации большинства CD8+Т-лимфоцитов. Пролиферация. (3) На третьем этапе активированные Т-клетки под влиянием градиента экспрессии хемокинов направляются в органы-мишени. Наиболее часто поражаются ткани кишечника, кожа, легкие и печень, локализация определяется экспрессией хемокинов, молекул адгезии и их рецепторов. Повреждающее действие в первую очередь оказывают цитотоксические лимфоциты и региональные макрофаги. CD8+Т-клетки распознают аллоантигены, презентуемые тканями реципиента, и запускают в них сигнал к апоптозу через взаимодействие FAS/FAS-лиганд и секрецию перфорина и гранзимов. CD4+ способны проявлять прямую цитотоксичность, но основная их роль заключается в продукции цитокинов. IFNγ активирует макрофаги, которые создают провоспалительное окружение, что наряду с продукцией активных форм кислорода и протеолитических ферментов опосредует повреждение тканей. Высвобождение PAMP и DAMP в тканях, пораженных аутоиммунной реакцией, дополнительно активирует макрофаги и формирует петлю положительной обратной связи.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

