

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

Том 18, № 1. С. 1-100

2016

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Gallios – совершенный проточный цито- флуориметр для научных исследований

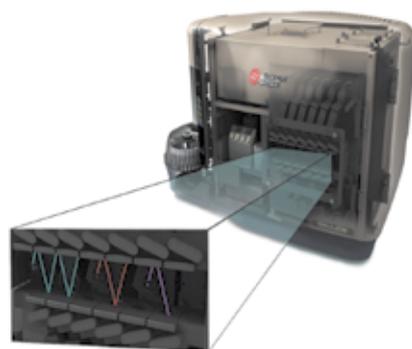
Gallios решает исследовательские задачи в медицине, биологии, фармакологии и любой другой, когда необходима проточная цитофлуориметрия. Примеры решаемых задач:

- идентификация популяций клеток со специфическими поверхностными и внутриклеточными маркерами.
- исследование митотического цикла и пloidности клеток.
- анализ программируемой клеточной гибели (апоптоз).
- оценка эффективности трансфекции клеток и многое другое.



* позвоните и мы расскажем, как измерять частицы размером в 200 нм цитометром Gallios

GALLIOS



- скорость до **25 000** событий в секунду
- до **четырёх** твердотельных лазеров на борту: 488, 638, 405 и 561 нм
- регистрация до **10** параметров флуоресценции
- чувствительность по размеру от **0,404 мкм***



KALUZA

Kaluza для Gallios – оцените экономию времени и гибкость анализа с программным обеспечением для обработки данных и проведения эксперимента

- интуитивный интерфейс.
- быстрая компенсация.
- высокая скорость обработки данных.
- работа с огромными файлами – до 200 млн. событий.
- создание и настройка протокола эксперимента offline.
- симулятор цитометра.
- неограниченное количество отмен действий.



**BECKMAN
COULTER**
Life Sciences

ООО "Бекмен Культер" 109004 Москва, ул. Станиславского, д. 21, стр. 3
тел. +7 (495) 984 67 30, факс +7 (495) 984 67 31 lsr-russia@beckman.com
www.kaluzasoftware.com

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2016, том 18

№ 1

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 19.01.2016 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 12,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1018

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

Линегин 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 Рамбам, заведующий кафедрой фармакологии медицинского факультета, Брно, Чехия

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

**MEDICAL
IMMUNOLOGY/
MEDITSINSKAYA
IMMUNOLOGIYA**

January-February

2016, volume 18

No. 1

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 19.01.2016. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 12,5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Produced at the IPK Beresta Printing House.

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

Phone: (812) 388-90-00

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

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

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnosics and Immunotherapy, Chief, Moscow, 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

Козлов В.А.

КЛЕТКИ-СУПРЕССОРЫ – ОСНОВА ИММУНОПАТОГЕНЕЗА АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 7

Колесникова Н.В., Козлов И.Г., Гурьянова С.В., Коков Е.А., Андропова Т.М.

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
МУРАМИЛДИПЕПТИДОВ В ЛЕЧЕНИИ АТОПИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ** 15

Оригинальные статьи

Бердюгина О.В., Ершова А.В.

**ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФАГОЦИТОВ КРОВИ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ
ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ЛЕГКИХ** 21

Бернс С.А., Киприна Е.С., Шмидт Е.А., Веремеев А.В., Барбараш О.Л.

**ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ НА ГОСПИТАЛЬНОМ ЭТАПЕ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ
КЛИНИЧЕСКИМИ ВАРИАНТАМИ ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА** 33

Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Гордеева Л.А., Мун С.А., Титов В.А., Костянюк М.В., Вафин И.А., Рагожина С.Е.

**АНТИТЕЛА ПРОТИВ БЕНЗО[А]ПИРЕНА И ПОЛИМОРФИЗМ CYP1A1*2A, CYP1A2*1F, GSTT1, GSTM1 У ЗДОРОВЫХ
МУЖЧИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО** 41

Коробова С.В., Корнилаева Г.В., Топорова В.А., Николаева И.А., Трубоченинова Л.П., Трефилеева Н.Ф., Сизякина Л.П.,
Сидорович И.Г., Апарин П.Г., Хаитов Р.М.

**ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ АКТУАЛЬНЫЕ
АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИЧ** 51

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

**СПОНТАННАЯ И ЛПС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ
БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ** 63

Краткие сообщения

Куртасова Л.М., Шакина Н.А., Шмидт А.Р.

**КЛЕТОЧНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНТЕРФЕРОНУ- $\alpha 2$ IN VITRO У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ
МОНОНУКЛЕОЗОМ, ВЫЗВАННЫМ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРР** 79

Дьякова М.Е., Журавлев В.Ю., Эсмедляева Д.С., Перова Т.Л.

**ФЕРМЕНТЫ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ФИБРОЗНО-КАВЕРНОЗНОГО
ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ** 85

Захватов А.Н., Козлов С.А., Аткина Н.А., Дудоров И.И.

ДИНАМИКА УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ 91

Правила для авторов 97

Авторский указатель 100

Предметный указатель 100

CONTENTS

Reviews

Kozlov V.A.

SUPPRESSOR CELLS – THE BASIS OF IMMUNOPATHOGENESIS AUTOIMMUNE DISEASES 7

Kolesnikova N.V., Kozlov I.G., Guryanova S.V., Kokov E.A., Andronova T.M.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF MURAMYL DIPEPTIDE IN THE TREATMENT OF ATOPIC DISEASES 15

Original articles

Berdyugina O.V., Yershova A.V.

FUNCTIONAL AND METABOLIC FEATURES OF BLOOD PHAGOCYTES AT DIFFERENT FORMS OF TUBERCULAR INFLAMMATORY PROCESS OF LUNGS 21

Berns S.A., Kiprina E.S., Shmidt E.A., Veremeev A.V., Barbarash O.L.

DYNAMICS OF CYTOKINE LEVELS IN THE HOSPITALIZED PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL TYPES OF ACUTE CORONARY SYNDROME 33

Glushkov A.N., Polenok E.G., Gordeeva L.A., Mun S.A., Titov V.A., Kostyanko M.V., Vafin I.A., Ragozhina S.E.

ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE AND POLYMORPHISMS OF CYP1A1*2A, CYP1A2*1F, GSTT1, AND GSTM1 GENES IN HEALTHY MEN AND LUNG CANCER PATIENTS 41

Korobova S.V., Kornilaeva G.V., Toporova V.A., Nikolaeva I.A., Trubcheninova L.P., Trefilyeva N.F., Sizyakina L.P., Sidorovich I.G., Aparin P.G., Khaïtov R.M.

IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTIC OF SYNTHETIC PEPTIDES SIMILAR TO ACTUAL HIV ANTIGEN DETERMINANTS 51

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

SPONTANEOUS AND LPS-INDUCED PRODUCTION OF 26 CYTOKINES SECRETED BY BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS DURING OF CELL THERAPY 63

Short communications

Kurtasova L.M., Shakina N.A., Schmidt A.R.

IN VITRO CELLULAR RESPONSE TO INTERFERON- α 2 IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS CAUSED BY EPSTEIN-BARR VIRUS 79

Dyakova M.Ye., Zhuravlev V.Yu., Esmedlyaeva D.S., Perova T.L.

ROLE OF PURINE METABOLISM ENZYMES IN IMMUNE PATHOGENESIS OF FIBRO-CAVERNOUS PULMONARY TUBERCULOSIS 85

Zahvatov A.N., Kozlov S.A., Atkina N.A., Dudorov I.I.

TIME COURSE OF CYTOKINE LEVELS IN EXPERIMENTAL POSTTRAUMATIC ARTHRITIS 91

Instructions to Authors 97

Author index 100

Subject index 100

КЛЕТКИ-СУПРЕССОРЫ – ОСНОВА ИММУНОПАТОГЕНЕЗА АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Козлов В.А.

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

Резюме. Обсуждается проблема иммунопатогенеза аутоиммунной патологии. Главное внимание уделяется проблеме участия в патогенезе аутоиммунных заболеваний клеток супрессоров различного происхождения (Treg, мезенхимальные стволовые клетки, клетки-супрессоры миелоидного происхождения). Большое значение в патогенезе придается процессу гомеостатической пролиферации лимфоцитов. Литературные данные свидетельствуют о том, что при аутоиммунной патологии регистрируется снижение функциональной активности обозначенных выше популяций клеток-супрессоров, включая Treg, мезенхимальные стволовые клетки, клетки-супрессоры миелоидного происхождения. Именно на фоне снижения активности клеток-супрессоров появляются клоны аутоагрессивных цитотоксических лимфоцитов, синтезируются аутоантитела, которые и обуславливают формирование аутоиммунной патологии. При этом следует учитывать, что все эти процессы протекают на фоне изменений в иммунной системе, индуцированных гомеостатической пролиферацией лимфоидных клеток.

Ключевые слова: аутоиммунные реакции, клетки-супрессоры, гомеостаз, пролиферация лимфоцитов

SUPPRESSOR CELLS – THE BASIS OF IMMUNOPATHOGENESIS AUTOIMMUNE DISEASES

Kozlov V.A.

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

Abstract. The issues of immune pathogenesis in autoimmune pathology are discussed in this review. The main attention is drawn to potential pathogenetic role of various suppressor cell populations, including T-regulatory cells, mesenchymal stem cells, myeloid lineage-derived suppressors. Homeostatic lymphocyte proliferation is considered to be of great importance for pathogenesis of autoimmune disorders. Recent data from literature suggest that the autoimmune diseases are characterized by reduced activity of the mentioned suppressor cell populations, thus being a possible prerequisite for development of autoaggressive clones of cytotoxic lymphocytes, increased synthesis of autoantibodies leading to evolving autoimmune pathology. It should be, however, noted, that all these processes are accompanied by changes in the immune system induced by homeostatic proliferation of lymphoid cells.

Keywords: autoimmunity, suppressor cells, homeostasis, lymphocyte proliferation

Адрес для переписки:

Козлов Владимир Александрович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-66-27.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: vako40@yandex.ru

Address for correspondence:

Kozlov Vladimir A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology,
Novosibirsk, Russian Federation
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-66-27.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: vako40@yandex.ru

Образец цитирования:

В.А. Козлов, «Клетки-супрессоры – основа
иммунопатогенеза аутоиммунных заболеваний»
// Медицинская иммунология, 2016, Т. 18, № 1. С. 7-14.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-7-14

© Козлов В.А., 2016

For citation:

V.A. Kozlov, "Suppressor cells – the basis of immunopathogenesis
autoimmune diseases", *Medical Immunology (Russia)*
Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 7-14.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-7-14

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-7-14>

Многие заболевания протекают на фоне измененных функций иммунной системы организма. Одно из этих изменений характеризуется снижением функций иммунорегуляторных клеток, или иммуносупрессией. Тогда иммуносупрессия – это снижение функций иммунной системы, это подавление активности фагоцитов, это уменьшение выработки антител, это снижение цитотоксической активности клеток иммунной системы.

На уровне организма – это хронические воспалительные процессы любой органной локализации, это ослабленный вакцинальный иммунитет, это повышенная чувствительность к инфекции, это развитие аутоиммунных и аллергических заболеваний, это увеличенная вероятность развития опухоли, раннего развития атеросклероза и, наконец, ускоренное приближение старости. Следовательно, аутоиммунные заболевания также относятся к заболеваниям воспалительного генеза. Принципиальным различием между всеми этими патологическими состояниями является различный уровень супрессии функций иммунной системы: при одних формируется состояние «гиперфункции» супрессорных механизмов (например, злокачественная опухоль), а при других – их «гипофункция» (например, аутоиммунная патология).

Известно, что специфическая эффекторная функция иммунной системы в организме реализуется, по существу, двумя популяциями им-

мунокомпетентных клеток: цитотоксическими Т-лимфоцитами и антителопродуцирующими клетками В-клеточного происхождения, отвечающими за выработку антител, принадлежащих к различным классам иммуноглобулинов. Что интересно, если неспецифической цитотоксичностью обладают клетки различного происхождения (естественные киллеры, макрофаги, дендритные клетки, моноциты, эозинофилы), то продукция антител является неотъемлемой функцией только антителообразующих клеток.

Совсем по-другому обстоят дела с регуляторными клетками различного происхождения. Нарисунке 1 представлена схема дифференцировки стволовых клеток двух различных популяций: полипотентных стволовых кроветворных клеток (ПСКК) и мезенхимальных (МСК), стромальных стволовых клеток. Клеточные представители всех направлений дифференцировки ПСКК на определенной стадии процесса обладают супрессорной активностью в отношении эффекторных клеток иммунной системы и принимают активное участие в формировании специфического иммунного ответа, определяя его величину. Свойствами иммуносупрессии обладают: эритробласты [2], миелобласты – предшественники нейтрофилов и макрофагов, Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки и макрофаги. То же самое относится и к клеткам, происходящим из МСК. Например, фибробласты при определенных условиях могут подавлять пролиферацию лимфоцитов

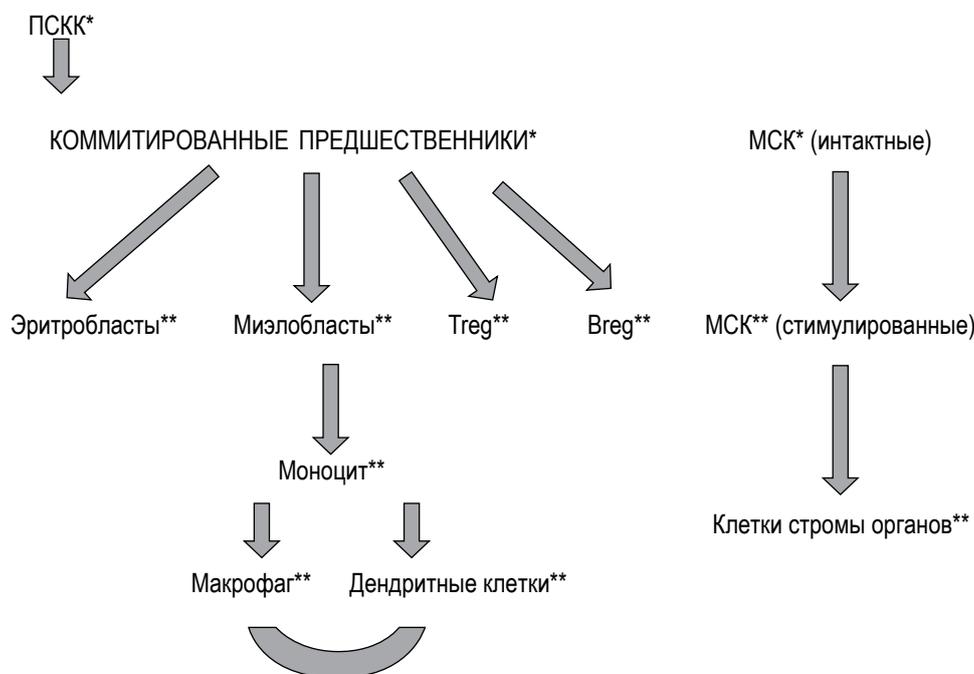


Рисунок 1. Клетки с иммуносупрессорной активностью в процессе дифференцировки ПСКК (полипотентные стволовые кроветворные клетки) и МСК (мезенхимальные стволовые клетки)

Примечание. * – клетки, не обладающие супрессорной активностью;

** – клетки, обладающие супрессорной активностью.

[20, 22]. Сами МСК также обладают супрессорной активностью, но только после стимуляции их различными цитокинами [16]. Кстати, эта характеристика МСК является их принципиальным отличием от другой популяции стволовых клеток, от ПСКК, описание супрессорной активности которых отсутствует в литературе. Это вновь поднимает нерешенный вопрос о происхождении МСК. Их иммуносупрессорная активность вместе с их способностью презентировать антиген [11] может говорить о том, что они являются либо потомками клетки-предшественника, пока еще не идентифицированной, либо они все-таки потомки ПСКК.

Из таблицы 1 можно видеть, что количество клеток, обладающих иммуносупрессорной активностью во много раз превышает количество эффекторных клеток, реализующих специфические клеточный и гуморальный иммунные ответы. И если последние являются лимфоцитами Т- и В-клеточного происхождения, то клетки-супрессоры принадлежат к разным клеточным популяциям, относящимся к различным росткам лимфо- и гемопоэза.

С точки зрения иммунопатогенеза аутоиммунные заболевания следует рассматривать, используя два положения современной иммунологии. С одной стороны, наличие достаточно большого разнообразия аутоантител у больных данных патологий свидетельствует о превалировании активности Th2-клеток, а наличие признаков аутоцитотоксичности говорит о преимущественной активности Th1-клеток. Но в то же время все это свидетельствует, несомненно, о недостаточной функциональной активности клеток-супрессоров как классических представителей данной популяции клеток (Treg, клетки-супрессоры миелоидного происхождения), так и тех клеточных субпопуляций, которые временно, в зависимости от сложившихся условий внутри иммунной системы, приобретают иммуносупрессивные свойства (макрофаги, дендритные

клетки, мезенхимальные стволовые клетки и др.). Например, что касается ревматоидного полиартрита, течение заболевания протекает на фоне повышенной активности клеток Th1, которая выражается в повышенной продукции таких провоспалительных молекул, как IL-1, IL-6, TNF α , PGE2, IFN γ . Именно последний, например, отвечает за индукцию таких супрессорных молекул воспалительной направленности, как неоптерин (продукт метаболизма GTP-cyclohydrolase-1) и IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase). Иммуносупрессивный эффект IDO реализуется путем снижения уровня внеклеточного триптофана, необходимого для пролиферации клеток, включая лимфоциты, а также за счет продуктов катаболизма триптофана, с ведущей ролью среди них кинуренина [35]. И вновь необходимо подчеркнуть, что такая повышенная активность популяции Th1-клеток не обходится без снижения количества и качества функционирования иммунокомпетентных клеток-супрессоров самого различного генеза. Показано, что количество CD4⁺CD25^{high}CD127^{low/-}Treg снижено у больных РА по сравнению со здоровыми донорами [24]. В норме у здоровых доноров их количество определяется как 1-5% от общего числа CD4⁺T-клеток в периферической крови. Считается, что одним из механизмов снижения активности Treg при РА является негативное действие на них TNF α с его ведущей ролью в патогенезе данного заболевания. Эти данные подтверждаются увеличением уровня Treg у больных РА после проведения терапии антителами к данному цитокину [38]. Кроме того, у этих же больных регистрируется снижение уровня IL-35, оказывающего стимулирующее влияние на активность Treg [30].

Несомненно, участие в аутоиммунных процессах и регуляторных В-клеток, или Breg (B10). Основополагающие доказательства базируются на экспериментальных данных. Достаточно многочисленные исследования свидетельствуют о патогенетической роли Breg в развитии аутоим-

ТАБЛИЦА 1. ОБЩЕЕ ЧИСЛО КЛЕТОК С ИММУНОСУПРЕССОРНОЙ АКТИВНОСТЬЮ РАЗЛИЧНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Т-клетки	11
В-клетки	1
Макрофаги	1(M2)
Дендритные клетки	1
Нейтрофилы	1(N2)
МСК	1 (стимулированные)
КСМП (клетки-супрессоры миелоидного происхождения)	3 (гранулоидные, моноцитарные, IL-1-индуцированные)
Фибробласты стромы органов	1
Эндотелиальные клетки	1
Эритроидные клетки-супрессоры	1

мунной патологии на мышцах. Показано, что любой способ уменьшения содержания этих клеток в эксперименте приводит к ускорению развития у мышей целого ряда патологических состояний, включая энцефаломиелит, ревматоидный полиартрит, системную красную волчанку и др. И в то же время введение мышам с аутоиммунными патологиями Vreg-клеток в достаточном количестве обуславливает явный терапевтический эффект. Главный иммуносупрессивный механизм Vreg основан на их способности продуцировать IL-10 [10, 40]. Несмотря на имеющиеся литературные данные об увеличении содержания в периферической крови Vreg при различных аутоиммунных патологиях, ряд данных свидетельствует о снижении супрессорной функции этих клеток, о понижении их чувствительности к стимулирующим эффектам со стороны, например, тех же Т-клеток [23].

В последнее время широко обсуждается проблема иммуносупрессивной активности мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Изучены многие и многие супрессивные механизмы этих клеток, которые включают в себя подавление пролиферации Т- и В-лимфоцитов, пролиферации НК-клеток, подавление дифференцировки дендритных клеток из моноцитов, подавление продукции целого ряда цитокинов [21, 32]. Описаны терапевтические эффекты вводимых МСК больным животным с целым рядом аутоиммунных патологий, в основе которых и лежит иммуносупрессивная активность этих клеток [15]. Но в то же время имеются данные, свидетельствующие об изменении супрессорной активности МСК при аутоиммунных патологиях в сторону уменьшения ее выраженности. Это было описано для ревматоидного артрита в эксперименте, где, по-видимому, TNF α выступает в роли ингибитора супрессорной активности МСК и стимулятора их миграции в полость суставов, где в отсутствие супрессорной активности МСК могут выступать в роли индуктора воспаления в суставе. Проведение анти-TNF α иммунотерапии нормализовало нарушенные функции МСК [7, 25]. Одним из механизмов снижения супрессорной активности МСК является подавление в них экспрессии Jagged-1 (лиганда для Notch рецептора на Т-клетках), индуцированное лигандами для TLR3 и TLR4. Сниженная способность МСК подавлять пролиферацию Т-лимфоцитов была описана у больных с апластической анемией, с иммунной тромбоцитопенической пурпурой и с миелодиспластическим синдромом [4, 26, 33].

Одним из важнейших механизмов индукции аутоиммунной патологии является процесс гомеостатической пролиферации Т-лимфоцитов [1, 37]. Литературные данные свидетельствуют

о том, что в процессе онтогенеза иммунная система человека претерпевает неоднократно изменения количественного и качественного состава клеток, формирующих данную гомеостатическую систему. И прежде всего, это касается лимфоцитов, как основной морфофункциональной составляющей иммунного гомеостаза. Уже через год после рождения начинается возрастная инволюция тимуса у человека, связанная с уменьшением количества лимфоцитов в данном органе. Самые различные факторы эндогенного (стресс, иммунный ответ, травма) и экзогенного (различные физические и химические факторы характера) обуславливают уменьшение числа лимфоцитов (как Т-, так и В-) в организме. Размеры этого снижения напрямую зависят от происхождения фактора, от его интенсивности и продолжительности действия и, конечно же, от возраста самого организма. Естественно, в организме существуют механизмы восстановления численности лимфоцитов, без которых каждое незначительное воздействие, индуцирующее снижение числа лимфоцитов, заканчивалось бы глубокой лимфопенией, формированием выраженного иммунодефицитного состояния.

Принято считать, что гомеостатическая пролиферация (ГПр) (homeostatic proliferation, или homeostatic peripheral expansion) обозначает процесс драматического митотического увеличения зрелых Т-клеток в условиях лимфопении любого генеза, являясь процессом, с помощью которого Т-клетки в лимфопеническом организме делятся в отсутствие чужеродного антигена, чтобы количественно восстановить пул лимфоцитов на периферии. Считается, что для наивных (naïve) Т-клеток необходим постоянный подпороговый сигнал от контакта Т-клеточных рецепторов (ТКР) с молекулами главного комплекса гистосовместимости (ПЛГКГС), чтобы персистировать в состоянии покоя. При отсутствии такого сигнала Т-клетки постепенно погибают через апоптоз. В то же время при индукции лимфопении эти же сигналы становятся сигналами для ГПр на всем пространственно-временном протяжении процесса, вплоть до восстановления пула лимфоцитов. Необходимо подчеркнуть, что именно взаимодействие ТКР и ПЛГКГС лежит в основе формирования процесса ГПр для наивных Т-клеток. Важным это представляется потому, что последний протекает без участия чужеродных антигенов и что здесь, по-видимому, мы имеем дело с основополагающим механизмом возникновения аутоиммунных заболеваний. Получается, что в процессе ГПр в иммунной системе накапливаются клетки, способные реагировать против собственных антигенов, обуславливая возможность формирования аутоиммунной патологии. Почему

же тогда в процессе гомеостатической пролиферации не срабатывают регуляторные Т-клетки-супрессоры (Treg)? Предполагается, что либо они менее чувствительны к лимфопении и позднее начинают пролиферировать с более медленным темпом пролиферации, либо IL-7, главный лимфокин, отвечающий за пролиферативную активность наивных CD4⁺T-клеток в процессе ГПр, подавляет пролиферацию Treg, либо задействованы оба эти механизма [1]. Интересно, что недостаточность функциональной активности супрессорных Treg сопровождается как процесс ГПр, который совсем не обязательно закончится индукцией аутоиммунной патологии, так и само аутоиммунное заболевание, при котором данный факт является одним из основных патологических механизмов развития заболевания. Важно еще раз подчеркнуть, что существует убедительная ассоциация между гомеостатической пролиферацией лимфоцитов, индуцированной лимфопенией, и развитием аутоиммунного заболевания. При этом одна лимфопения еще не является абсолютной необходимостью для развития заболевания. Дополнительным фактором будут являться нарушения в продукции IL-7 и IL-15, которые выступают в роли индукторов пролиферации лимфоцитов [27]. Что касается количественных и качественных изменений в популяциях клеток-супрессоров при аутоиммунной патологии, то имеются убедительные данные об уменьшении количества Treg при аутоиммунных патологиях у мышей, об их ведущей роли в развитии заболевания. В отношении аутоиммунных заболеваний у человека литературные данные свидетельствуют об изменении их количества в периферической крови при ревматоидном артрите, системной красной волчанке, рассеянном склерозе. Ударение делается на снижение супрессорной активности самих Treg за счет увеличения экспрессии CD127 маркера, снижения экспрессии CTLA-4 и PD-1 молекул, активно участвующих в супрессорных механизмах Treg [14, 39]. Небезынтересными данными представляются результаты о снижении активности Treg при колите воспалительного генеза на фоне подавленной экспрессии у них Nrp1 (neuropilin-1) маркера, индуктора стабильного состояния Treg, взаимодействующего с Sema4a (semaphorin-4a) молекулами на тех же дендритных клетках [13]. Помимо снижения активности самих Treg отмечается уменьшение чувствительности клеток-эффекторов иммунной системы к действию клеток-регуляторов, где большое значение придается таким провоспалительным цитокинам, как TNF α и IL-6. Последнему отводится роль фактора, индуцирующего передифференцировку Treg в проаутоиммунные Th17-клетки, что также является одним из меха-

низмов уменьшения содержания регуляторных Treg-клеток при аутоиммунной патологии на фоне возрастающего количества IL-17 T-клеток. При системной красной волчанке (СКВ) регистрируется снижение продукции IL-2, крайне необходимого для поддержания пролиферативной активности Treg [8, 29]. Вполне вероятно, что на фоне снижения активности Treg повышается продукция IFN α , который участвует в механизмах презентации аутоантигенов и индукции образования аутоантител при той же СКВ [6], в то время как Treg ингибируют процесс презентации антигена дендритными клетками [34]. Особо следует обратить внимание на экспериментальные данные, полученные на мышах с различными аутоиммунными заболеваниями, которые практически однозначно свидетельствуют о положительном терапевтическом и профилактическом эффекте вводимых T-регуляторных клеток. Это было показано на таких моделях, как СКВ, РА, рассеянный склероз, диабет 1-го типа и др.

В последнее время в литературе уделяется большое внимание роли клеток-супрессоров миелоидного происхождения (КСМП) в патогенезе многих заболеваний, включая аутоиммунную патологию. Популяцию этих супрессоров разделяют на две субпопуляции: моноцитарного и гранулоцитарного происхождения. По существу, КСМП являются стадиями дифференцировки соответствующих дифференцировочных направлений коммитированных предшественников. Накоплены четкие данные об их определяющей роли в подавлении активности иммунокомпетентных клеток при опухолевом росте [18]. Что касается аутоиммунной патологии, то определенно можно говорить о наличии их при данных заболеваниях, о возможности подавления развития аутоиммунных процессов с помощью введения этих клеток в эксперименте [12, 13, 17]. И в то же время имеются противоречивые данные об изменении их количества при этих патологиях. Несомненно одно: необходимо изучать проблему роли КСМП в патогенезе аутоиммунных заболеваний, проблему возможного использования их в клеточной иммунотерапии.

Следовательно, можно думать, что в основе патогенеза аутоиммунных заболеваний лежат не только, а может быть, не столько механизмы реализации активности аутоагрессивных клеток Т- и В-клеточного происхождения, которые, естественно, вносят существенный вклад в развитие заболевания, реагируя на собственные антигены. По-видимому, надо приходить к убеждению, что основной вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний вносят механизмы, нарушающие нормальное функционирование иммунокомпетентных клеток-супрессоров, по-

давяя их супрессорную активность, что и приводит к появлению и формированию клонов аутоагрессивных клеток иммунной системы.

Как видно из таблицы 1, около 10 субпопуляций Т-лимфоцитов обладают супрессорной функцией и с помощью различных механизмов могут подавлять активность иммунокомпетентных клеток-эффекторов, подавлять реакцию иммунной системы на различного рода антигенные воздействия, включая вирусы, бактерии, опухолевые клетки и т.д. В данных случаях клетки-супрессоры осуществляют регуляторные механизмы для количественного ограничения роста клеток-эффекторов до оптимальных параметров, необходимых для уничтожения вирусов, бактерий, раковых клеток. Однако, имеется другая биологическая задача у всего разнородного семейства клеток-супрессоров, которая, может быть, наиглавнейшая, — это не дать реагировать клеткам-эффекторам и клеточного, и гуморального звеньев, против своих собственных аутоантигенов, т.е. исключить возможность нарушения иммунной толерантности к собственным антигенам. Учитывая большое разнообразие клеток с иммуносупрессорной активностью, следует, возможно, говорить о наличии в организме клеточной системы из супрессорных элементов, которая (система) отвечает за механизмы толерантности клеток иммунной системы к аутоантигенам, за неразвитие в организме аутоиммунной патологии.

Следует считать доказанным, что в организме имеются механизмы, отвечающие за подавление активности клеток-супрессоров, принимая во внимание негативное действие на Treg того же TNF α . Однако одним из таких специфических клеточных механизмов могут быть описанные цитотоксические лимфоциты с активностью против IDO-экспрессирующих клеток, а, следовательно, подавляющих интенсивность индуцированной супрессии. При этом, помимо уменьшения количества классических Treg, регистрируется увеличение продукции IL-6 и IL-17, последний из которых играет ведущую роль в формировании патологического процесса при РА, а первый принимает участие в передифференцировке Treg в Th17 с последующим уменьшением числа Treg. Кроме того, обнаружена, опять же, активность иммунной системы против таких характерных для клеток-супрессоров молекул, как PD-L1 и FoxP3 [3, 5], что также имеет отношение к снижению функции клеток-супрессоров. Сейчас уже разрабатываются методы терапии опухолевой патологии с помощью введения этих противосупрессорных цитотоксических лимфоцитов [3]. В исследованиях регистрируется еще один меха-

низм подавления активности иммунокомпетентных клеток-эффекторов, основанный на индукции Т-клеток против эрготопов, подобных CD25 и HSP60, экспрессирующихся с высоким уровнем только на активированных Т-лимфоцитах.

Функция этих антиэрготопических Т-клеток заключается в ограничении возможной сверхвеличины любого иммунного ответа, включая ответ к аутоантигенам. Оказывается, что и этот супрессорный механизм работает не достаточно активно при аутоиммунных процессах [36]. Был обнаружен сниженный антиэрготопический ответ у крыс на модели адьювантного, аутоиммунного артрита и пациентов с рассеянным склерозом [19, 28].

Получается, что ослабление функции иммунокомпетентных клеток-супрессоров отвечает за формирование патологического, аутоиммунного процесса. С другой стороны, возникшие аутоагрессивные, цитотоксические клеточные элементы начинают работать как против регуляторных клеток, индуцирующих развитие клеток-супрессоров, способствуя углублению патологического процесса, так и против самих эффекторных, супрессорных клеток. Тогда терапия должна быть направлена, прежде всего, на стимуляцию функций многочисленных клеток-супрессоров с целью реформирования состояния новой иммунной толерантности к собственным антигенам организма, которое было до начала заболевания. Можно думать, что снижение активности клеток-супрессоров разного генеза способствует нарушению механизмов иммунологической толерантности с последующим формированием аутоиммунной патологии. Это с одной стороны, а с другой — указанное снижение ложится в основу появления клонов клеток также аутоагрессивных, но уже не против тканевых антигенов, а против аутоантигенных субстанций, так или иначе связанных с клетками, участвующими в формировании супрессивных механизмов. «Сниженная эффективность супрессии индуцирует аутоагрессию и, одновременно, антисупрессию».

Следовательно, аутоиммунная патология характеризуется снижением активности клеток, представляющих собой супрессорную систему в организме. И поэтому всю иерархию аутоиммунных заболеваний, к которым относят более 80 синдромов и болезней, следует отнести к заболеваниям с гипофункцией иммуносупрессорных механизмов. Отсюда — разработка новых методов терапии должна базироваться на способах стимуляции активности клеток-супрессоров различного генеза. Достойное место здесь должна занять клеточная иммунотерапия, основанная на кли-

ническом применении самих клеток-супрессоров, полученных в достаточном количестве в условиях *in vitro*. При этом необходимо учитывать, в случае использования для иммунотерапии ау-

тологических клеток-супрессоров, что функциональная активность последних, как правило, снижена, и следует искать способы восстановления ее до контрольных значений хотя бы.

Список литературы / References

1. Козлов В.А. Гомеостатическая пролиферация лимфоцитов в аспекте иммунопатогенеза различных заболеваний // Иммунология, 2006. Т. 27, № 6. С. 378-382. [Kozlov V.A. Homeostatic lymphocyte proliferation in immunopathogenesis aspect of different diseases. *Immunologiya = Immunology*, 2006, Vol. 27, no. 6, pp. 378-382. (In Russ.)]
2. Цырлова И.Г., Кашлакова Н.В., Козлов В.А. Влияние клеток «эритропоэтической» селезенки на пролиферацию Т- и В-лимфоцитов // Иммунология, 1986. № 4. С. 27-29. [Tsyrolova I.G., Kashlakova N.V., Kozlov V.A. Influence of the "erythropoietic" spleen cells on T- and B-lymphocyte proliferation. *Immunologiya = Immunology*, 1986, no. 4, pp. 27-29. (In Russ.)]
3. Andersen M.H. Potential roles of self-reactive T cells in autoimmunity: lesson from cancer immunology. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 60, no. 2-3, pp. 156-164.
4. Bacigalupo A., Valle M., Podesta M., Pitto A., Zocchi E., De Flora A., Pozzi S., Luchetti S., Frassoni F., Van Lint M.T., Piaggio G. T-cell suppression mediated by mesenchymal stem cells is deficient in patients with severe aplastic anemia. *Exp. Hematology*, 2005, Vol. 33, no. 7, pp. 819-827.
5. Becker J.C., Straten P.Th., Andersen M.H. Self-reactive T cells: suppressing the suppressors. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2014, Vol. 63, no. 4, pp. 313-319.
6. Blanco P., Palucka A.K., Gill M., Pascual V., Banchereau J. Induction of Dendritic Cell Differentiation by IFN- α in Systemic Lupus Erythematosus. *Science*, 2001, Vol. 294, no. 5546, pp. 1540-1543.
7. Bouffi C., Djouad F., Mathieu M., Noel D., Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit. *Rheumatology*, 2009, Vol. 48, no. 10, pp. 1185-1189.
8. Buckner J.H. Mechanisms of impaired regulation by CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases. *Nat. Rev. Immunol.*, 2010, Vol. 10, no. 12, pp. 849-859.
9. Candando K.M., Lykken J.M., Tedder T.F. B10 cell regulation of health and disease. *Immunological Reviews*, 2014, Vol. 259, pp. 259-272.
10. Chan J.L., Tang K.C., Patel A.P., Bonilla L.M., Pierobon N., Ponzio N.M., Rameshwar P. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . *Blood*, 2006, Vol. 107, pp. 4817-4824.
11. Cripps J.G., Gorham J.D. MDSC in autoimmunity. *Int. Immunopharmacol.*, 2011, Vol. 11, no. 7, pp. 789-793.
12. Crook K.R., Jin M., Weeks M.F., Rampersad R.R., Baldi R.M., Glekas A.S., Shen Y., Esserman D.A., Little P., Schwartz T.A., Liu P. Myeloid-derived suppressor cells regulate T cell and B cell responses during autoimmune disease. *J. Leukocyte Biology*, 2015, Vol. 97, no. 3, pp. 573-582.
13. Delgoffe G.M., Woo S-R., Turnis M.E., Gravano D.M., Guy C., Overacre A.E., Bettini M.L., Vogel P., Finkelstein D., Bonnevier J., Workman C.J., Vignali D.A. Stability and function of regulatory T cells is maintained by a neuropilin-1-semaphorin-4a axis. *Nature*, 2013, Vol. 501, pp. 252-256.
14. Dilek N., Porier N., Hulin P., Mary C., Ville S., Vie H., Clemenceau B., Blancho G. Targeting CD28, CTLA-4 and PD-L1 costimulation differentially controls immune synapses and function of human regulatory and conventional T-cells. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 12, pp. 1-14.
15. Djouad F., Bouffi C., Ghannam S., Noel D., Jorgensen C. Mesenchymal stem cells: innovative therapeutic tools for rheumatic diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009, Vol. 5, pp. 392-399.
16. Fan H., Zhao G., Liu L., Liu F., Gong W., Liu X., Yang L., Wang J., Hou Y. Pre-treatment with IL-1 β enhances the efficacy of MSC transplantation in DSS-induced colitis. *Cellular and Molecular Immunology* 2012, Vol. 9, pp. 473-481.
17. Fujii W., Ashihara E., Hirai H., Nagahara H., Kajitani N., Fujioka K., Murakami K., Seno T., Yamamoto A., Ishino H., Kohno M., Maekawa T., Kawahito Y. Myeloid-derived suppressor cells play crucial roles in the regulation of mouse collagen-induced arthritis. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 191, pp. 1073-1081.
18. Gabilovich D.I., Nagaraj S. Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 9, no. 3, pp. 162-74.
19. Hafler D.A., Buchsbaum M., Weiner H.L. Decreased autologous mixed lymphocyte reaction in multiple sclerosis. *J. Neuroimmunology*, 1985, Vol. 9, pp. 339-347.
20. Haniffa M.A., Wang X-N., Holtick U., Rae M., Isaacs J.D., Dickinson A.M., Hilkens C.M.U., Collin M.P. Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, pp. 1595-1604.
21. Herrero C., Perez-Simon J.A. Immunomodulatory effect of mesenchymal stem cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2010, Vol. 43, no. 5, pp. 425-430.
22. Jones S., Horwood N., Cope A., Dazzi F. The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 5, pp. 2824-2831.

23. Kalampokis I., Yoshizaki A., Tedder T.F. IL-10-producing regulatory B cells (B10 cells) in autoimmune disease. *Arthritis Research and Therapy*, 2013, Vol. 15, Suppl. 1, pp. 1-12.
24. Kawashiri S.-Y., Kawashiri A., Okada A., Koga T., Tamai M., Yamasaki S., Nakamura H., Origuchi T., Ida H., Eguchi K. CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} Treg cell frequency from peripheral blood correlates with disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 2011, Vol. 38, no. 12, pp. 2517-2521.
25. Liotta F., Angeli R., Cosmi L., Fili L., Manuelli C., Frosali F., Mazzinghi B., Maggi L., Pasini A., Lisi V., Santarlasci V., Consoloni L., Angelotti M.L., Romagnani P., Parronchi P., Krampera M., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem Cells*, 2008, Vol. 26, no. 1, pp. 279-289.
26. Liu L.H., Chen B., Sun Z., Ye L.P., Shi B., Jin J.G., Zhao C.H. Immuno-suppressive effects on T cells mediated by mesenchymal stem cells from patients with myelodysplastic syndrome. *J. Exp. Hematology*, 2008, Vol. 16, no. 2, pp. 299-304.
27. Marleau A.M., Sarvetnick N. T cell homeostasis in tolerance and immunity. *J. Leuk. Biology*, 2005, Vol. 78, no. 3, pp. 575-584.
28. Mimran A., Cohen I.R. Regulatory T cells in autoimmune diseases: anti-ergotypic T cells. *Int. Rev. Immunol.*, 2005, Vol. 24, no. 3-4, pp. 159-179.
29. Miyara M., Gorochov G., Ehrenstein M., Musset L., Sakaguchi S., Amoura Z. Human FoxP3⁺ regulatory T cells in systemic autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, 2011, Vol. 10, no. 12, pp. 744-755.
30. Nakano S., Morimoto S., Suzuki S., Tsushima H., Yamanaka K., Sekigawa I., Takasaki Y. Immunoregulatory role of IL-35 in T cells of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, 2015, 1-9 pii: keu528.
31. Nie H., Zheng Y., Li R., Guo T.B., He D., Fang L., Liu X., Xiao L., Chen X., Wan B., Chin Y.E., Zhang J.Z. Phosphorylation of FOXP3 controls regulatory T cell function and is inhibited by TNF α in rheumatoid arthritis. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 3, pp. 322-328.
32. Noel D., Djouad F., Bouffi C., Mrugala D., Jorgensen C. Multipotent mesenchymal stromal cells and immune tolerance. *Leukemia and Lymphoma*, 2007, Vol. 48, no. 7, pp. 1283-1289.
33. Perez-Simon J.A., Tabera S., Sarasquete M.E., Diez-Campelo M., Canchado J., Sánchez-Abarca L.I., Blanco B., Alberca I., Herrero-Sánchez C., Cañizo C., San Miguel J.F. Mesenchymal stem cells are functionally abnormal in patients with immune thrombocytopenic purpura. *Cytotherapy*, 2009, Vol. 11, no. 6, pp. 698-705.
34. Peterson R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicologic Pathology*, 2012, Vol. 40, no. 2, pp. 186-204.
35. Prendergast G.C., Metz R., Muller A.J., Merlo L.M., Mandik-Nayak L. IDO2 in Immunomodulation and Autoimmune Disease. *Front Immunol.*, 2014, no. 5, p. 585.
36. Quintana F.J., Cohen I.R. Anti-ergotypic immunoregulation. *Scand. J. Immunol.*, 2006, Vol. 64, no. 3, pp. 205-210.
37. Surh C.D., Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity*. 2008, Vol. 29, no. 6, pp. 848-862.
38. Valenca X., Stephens G., Goldbach-Mansky R., Wilson M., Shevach E.M., Lipsky P.E. TNF downmodulation the function of human CD4⁺CD25^{hi} T-regulatory cells. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 1, pp. 253-261.
39. Vogel I., Kasran A., Cremer J., Kim Y.-J., Boon L., Van Gool S.W., Ceuppens J.L. CD28/CTLA/B7 costimulatory pathway blockade affects regulatory T-cell function in autoimmunity. *Eur. J. Immunol.*, 2015, pp. 1-10.
40. Yoshizaki A., Miyagaki T., DiLillo D.J., Matsushita T., Horikawa M., Kountikov E.I., Spolski R., Poe J.C., Leonard W.J., Tedder T.F. Regulatory B cells control T cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature*, 2012, Vol. 491, no. 7423, pp. 264-268.
41. Yi H., Guo C., Yu X., Zuo D., Wang X.Y. Mouse CD11b⁺Gr-1⁺ myeloid cells can promote Th17 cell differentiation and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 189, no. 9, pp. 4295-4304.

Автор:

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

Author:

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

Поступила 13.05.2015

Отправлена на доработку 25.06.2015

Принята к печати 29.06.2015

Received 13.05.2015

Revision received 25.06.2015

Accepted 29.06.2015

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МУРАМИЛДИПЕПТИДОВ В ЛЕЧЕНИИ АТОПИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Колесникова Н.В.¹, Козлов И.Г.², Гурьянова С.В.³, Коков Е.А.¹,
Андропова Т.М.⁴

¹ ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

² ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

⁴ ЗАО «Пептек», Москва, Россия

Резюме. Отмечаемый сегодня в мире рост аллергических заболеваний свидетельствует о несовершенстве существующей концепции фармакотерапии, не учитывающей этиопатогенетические аспекты атопии. Между тем осмысление клеточно-молекулярного механизма развития аллергопатологии создает предпосылки для развития новых терапевтических направлений, позволяющих эффективно воздействовать на патогенез аллергического воспаления и тем самым приводить к излечению. Поскольку одно из главных положений современной концепции регуляции адаптивного иммунитета заключается в антагонизме между двумя популяциями Т-хелперов (Th1 и Th2), осуществляемом в основном за счет действия $IFN\gamma$, продуцируемого активированными Th1, и IL-4, секретируемого активированными Th2, в обзоре обсуждаются перспективы иммунотерапии аллергических заболеваний, основанной на поляризации иммунного ответа – активации Th1-ответа и подавлении Th2. Указанная поляризация может быть реализована агонистами рецепторов врожденного иммунитета – синтетическими и природными минимальными биологически активными фрагментами (МБАФ) патоген-ассоциированных молекулярных образов. В этом отношении весьма перспективен единственный зарегистрированный в России в качестве лекарственного препарата на основе синтетического МБАФ – глюкозаминилмурамилдипептида (ГМДП) – иммуномодулятор Ликопид. Это обусловлено тем, что ГМДП, как активное действующее начало Ликопида, является высокоспецифическим лигандом NOD2-рецептора врожденного иммунитета, способен вызывать активацию фактора транскрипции NF- κ B и продукцию широкого спектра иммунорегуляторных цитокинов. Клинико-иммунологическая эффективность включения Ликопида в традиционную терапию атопических аллергических заболеваний (бронхиальной астмы, атопического дерматита, атопического варианта течения острого обструктивного бронхита) представлена обзором результатов доклинических и клинических исследований.

Ключевые слова: глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП), аллергические заболевания, атопия, патогенез, IgE

Адрес для переписки:

Гурьянова Светлана Владимировна
ФГБУН «Институт биоорганической химии им.
академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел.: 8 (495) 330-74-56.
E-mail: svgur@mail.ru

Address for correspondence:

Guryanova Svetlana V.
M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of
Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences
117997, Russian Federation, Moscow,
Mikhlukho-Maklay str., 16/10.
Phone: 7 (495) 330-74-56.
E-mail: svgur@mail.ru

Образец цитирования:

Н.В. Колесникова, И.Г. Козлов, С.В. Гурьянова,
Е.А. Коков, Т.М. Андропова, «Клинико-иммунологическая
эффективность и перспективы использования
мурамилдипептидов в лечении атопических заболеваний»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 15-20.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-15-20

© Колесникова Н.В. и соавт., 2016

For citation:

N.V. Kolesnikova, I.G. Kozlov, S.V. Guryanova, E.A. Kokov,
T.M. Andronova, "Clinical and immunological efficiency of
muramyl dipeptide in the treatment of atopic diseases", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 1, pp. 15-20. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-15-20

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-15-20>

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF MURAMYL DIPEPTIDE IN THE TREATMENT OF ATOPIC DISEASES

Kolesnikova N.V.^a, Kozlov I.G.^b, Guryanova S.V.^c, Kokov E.A.^a,
Andronova T.M.^d

^a Kuban State Medical Academy, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation

^b N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^c M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d CJSC Peptek, Moscow, Russian Federation

Abstract. Increased incidence of allergic diseases worldwide reflects some mangles of the existing pharmacotherapy concept which ignores some etiopathogenetic aspects of clinical atopy. Meanwhile, understanding cellular and molecular mechanisms of allergy may create prerequisites for development of new therapeutic areas, in order to effectively influence pathogenesis points of allergic inflammation and, thus, leading to therapeutic success. The review article concerns an antagonism between the two populations of T-helper cells (Th1 and Th2) carried out mainly by the action of IFN γ produced by activated Th1, and IL-4 secreted by activated Th2 which is at the heart of modern concept on the regulation of adaptive immunity. The prospects of immunotherapy of allergic diseases based on the polarization of the immune response are discussed, i.e., an activation of Th1 responses and Th2 suppression. This functional polarization can be mediated by the innate immune receptor agonist, i.e., synthetic and natural minimally-sized biologically active fragments (MBAF) with pathogen-associated molecular patterns. In this respect, a very promising drug registered in Russia is based on the synthetic MBAF, glucosaminylmuramyl dipeptide (GMDP), The licopid immunomodulator. This is due to the fact that GMDP, being an active substance of Licopid, is a highly specific ligand for the NOD2 receptor of innate immunity factors; it may cause activation of the NF- κ B transcription factor, and production of multiple immunoregulatory cytokines. Clinical and immunological efficacy of Licopid application in conventional therapy of atopic allergic diseases (asthma, atopic dermatitis, atopic variant of acute obstructive bronchitis) is presented as an overview of pre-clinical and clinical trials.

Keywords: glucosaminyl muramyl dipeptide (GMDP), allergic diseases, atopy, pathogenesis, IgE

Введение

Патогенетическую основу весьма распространенных сегодня аллергических болезней, определяющихся сенсибилизацией организма при воздействии генетических и средовых факторов [2, 11], составляют IgE-опосредуемые аллергические реакции, связанные с изменением соотношения Th2-/Th1-лимфоцитов за счет преобладания Th2-цитокинового профиля и снижения активности Th1-лимфоцитов. Существующая сегодня концепция фармакотерапии аллергических atopических заболеваний ставит своей задачей не лечение, а лишь контроль за их течением [15]. Речь идет о широком спектре стероидных противовоспалительных, иммуносупрессивных, антилейкотриеновых, мембраностабилизирующих, антигистаминных и бронходилатирующих препаратов, направленных на уменьшение частоты и тяжести обострений, удлинение продолжительности ремиссий и повышение качества жизни пациентов. Осмысление клеточно-молекулярного механизма развития аллергопатологии создало предпосылки для развития направлений терапии,

позволяющей эффективно воздействовать на патогенез аллергического воспаления и тем самым приводить к излечению. В частности, изменение дозы, пути и кратности введения аллергена в организм больных аллергическими заболеваниями на стадии ремиссии (аллерген-специфическая иммунотерапия, АСИТ) позволило в целом ряде случаев добиться переключения гуморального иммунного ответа с IgE на IgG тип и излечения пациентов от атопии [13, 14]. Наибольшее внимание в последние годы привлекает использование препаратов, способных целенаправленно поляризовать иммунный ответ на аллергены в сторону Th1-клеток [16].

В этом отношении наиболее перспективными «поляризаторами» иммунного ответа в настоящее время являются агонисты рецепторов врожденного иммунитета: синтетические и природные минимальные биологически активные фрагменты (МБАФ) патоген-ассоциированных молекул (РАМР), и в частности единственный зарегистрированный в России в качестве лекарственного препарата синтетического МБАФ – глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП) – иммуномоду-

лятор Ликопид. ГМДП представляет собой минимальный биологически активный фрагмент пептидогликана клеточной стенки всех известных бактерий. Он оказывает выраженное модулирующее действие на клетки иммунной системы, являясь активатором врожденной и адаптивной систем иммунитета [12].

Клинико-иммунологическая эффективность ГМДП (Ликопида) при комплексной терапии атопических аллергических заболеваний

Поскольку активное действующее начало Ликопида – ГМДП, как высокоспецифический лиганд NOD2-рецептора врожденного иммунитета, он способен вызывать активацию фактора транскрипции NF-κB и продукцию широкого спектра иммунорегуляторных цитокинов [17, 19]. Поэтому представляют интерес работы по изучению влияния иммуномодулятора на патогенетический механизм аллергического IgE-опосредованного воспаления. В настоящее время клиническими исследованиями продемонстрирована клинико-иммунологическая эффективность Ликопида при атопическом дерматите [4-6], бронхиальной астме [7], обструктивном бронхите атопического варианта течения [7]. Как правило, традиционная терапия включала гипоаллергенный быт, элиминацию причинно-значимых и облигатных аллергенов, использование противовоспалительной (местной и системной) терапии и, по необходимости, коррекцию дисфункций желудочно-кишечного тракта.

В частности, изучение клинической эффективности традиционной терапии с использованием Ликопида (основная клиническая группа) в лечении детей с обострением IgE-опосредованного атопического дерматита (АтД) средней степени тяжести, не имеющих на момент обследования признаков клинической манифестации сопутствующей бактериальной, вирусной и микотической инфекции, показало, что уже через 1 месяц от начала его применения наблюдалось сокращение площади поражения в 3,5 раза (при комплексной терапии – в 1,8 раза), а ко 2-му месяцу – в 3 раза (по сравнению с показателями через месяц лечения), при этом у 40% пациентов не выявлялись кожные проявления АтД [5]. Анализ интенсивности клинических проявлений АтД через месяц от начала терапии выявил более выраженное ее снижение в группе при использовании в традиционной терапии Ликопида (в 3,6 раза – через месяц, в 8,4 раза – через 2 месяца). Оценка субъективных данных (кожный зуд и нарушения сна) уже на 1-м месяце сочетанной терапии свидетельствует об их более выраженном снижении (в 37 раз), чем на фоне традиционной терапии (в 6,3 раза), причем у 85% детей, получавших в составе традиционной терапии Ликопид, кожный зуд и нарушение сна к концу пер-

вого месяца терапии отсутствовали. Итоговый расчет индекса SCORAD продемонстрировал его снижение у больных, получавших Ликопид в сочетании с традиционной терапией, в 4,2 раза (через 1 месяц) и в 14 раз (через 2 месяца), тогда как в группе с традиционной терапией отмечено его снижение лишь в 2,5 раза и в 4,4 раза соответственно. При оценке иммунологической эффективности сочетанной с Ликопидом терапии, наряду с нормализацией показателей основных функций нейтрофильных гранулоцитов (рецепторной, фагоцитарной, микробицидной), было выявлено статистически значимое снижение содержания иммуноглобулина Е в периферической крови, в то время как традиционная терапия практически не повлияла на его уровень.

Катамнестическая оценка (через 6 месяцев) исходов традиционной терапии, сочетающейся с иммуномодулятором Ликопид, и традиционной терапии продемонстрировала более высокую частоту обострения сопутствующих заболеваний (ангины, аденоидиты, респираторно-вирусные инфекции, ночной кашель), а также рецидивов АтД в группе сравнения, что послужило основанием для модификации иммуноориентированной терапии АтД, которая заключалась в назначении ранее предложенной схемы лечения с использованием Ликопида дважды, с интервалом в 2 месяца (суммарная доза препарата составила 50 мг) с оценкой ее клинической эффективности спустя 6 месяцев после окончания терапии [8]. Анализ результатов проведенного испытания пролонгированной иммуностропной терапии показал достоверное снижение числа обострений АтД (в 3,4 раза) относительно группы сравнения, более существенное снижение числа обострений сопутствующих заболеваний, что в целом свидетельствует о ее высокой клинической эффективности и целесообразности.

Е.О. Урбан (2004), применяя Ликопид в комплексной терапии детей со среднетяжелой формой бронхиальной астмы (БА) и сопутствующим синдромом вторичной иммунной недостаточности, получила положительный клинический результат в виде более выраженного снижения количества эпизодов ОРВИ в год, значительно уменьшения продолжительности обострений бронхообструктивного синдрома на фоне ОРВИ, а также более выраженной положительной динамики клинических проявлений БА, сопоставимой с результатами добавления в комплекс лечебных мероприятий у больных группы сравнения к ингаляционным глюкокортикостероидам (ИГКС) β2-агониста пролонгированного действия – формотерола [3]. Так, у пациентов, получавших Ликопид, была более значимой степень снижения дневных и ночных симптомов к окончанию периода наблюдения, степень

возрастания удельного веса легких приступов с одновременным уменьшением числа тяжелых. Наряду с этим, благодаря включению Ликопида в традиционную терапию, у части пациентов стало возможным снизить дозу ИГКС и перейти на базисную терапию препаратами кромоглинового ряда. Важно отметить, что наряду с позитивными клиническими эффектами Ликопида было выявлено достоверное снижение уровней содержания основных маркеров атопии — IgE и IL-4, что в совокупности с лабораторными признаками переключения иммунного ответа с Th2-типа на Th1 свидетельствовало о патогенетическом характере воздействия Ликопида на механизм аллергического воспаления.

Изучение эффективности применения Ликопида у детей с БА и частыми эпизодами ОРВИ в составе комплекса реабилитационных мероприятий на санаторном этапе показало сходную положительную динамику клинических, иммунологических и рентгенологических показателей [3]. Так, уже через неделю после начала реабилитационной терапии у всех больных было отмечено улучшение самочувствия, уменьшение количества жалоб и клинических проявлений заболевания. При этом анализ динамики показателей функции внешнего дыхания показал нарастание практически всех изучаемых параметров; при наблюдениях в течение года было отмечено достоверное уменьшение дневных и ночных симптомов, что позволило сократить потребность в бронхолитиках короткого действия (в 1,7-3 раза). При анализе иммунологических показателей после реабилитационной терапии с использованием Ликопида у 47,5% детей с исходно высоким уровнем IgE выявлено его трехкратное достоверное снижение.

Сведения о позитивных клинико-иммунологических эффектах комплексной терапии с включением в нее Ликопида получены у детей с острым обструктивным бронхитом (ООБ) [7], в отношении которого в последние годы отмечена высокая заболеваемость, тяжелое течение, частое развитие осложнений и переход в рецидивирующую обструктивную форму бронхита и бронхиальную астму [9, 18]. В ряде случаев у детей с БА и обструктивным бронхитом выявляется микоплазменная и хламидийная инфекция, формируются хронические очаги инфекции [20], возникают дисбиотические изменения в составе микрофлоры кишечника, выявляются плесневые и дрожжевые грибы, а также бактериальная флора, как триггеры обострений аллергических заболеваний [11]. В этой связи в настоящее время охарактеризованы два патогенетических варианта ООБ у детей, в основе развития которых лежат особенности иммунного ответа и степень выраженности изменений со стороны струк-

турно-функционального состояния клеточных мембран [9]. При этом если иммунный ответ при инфекционно-воспалительном варианте ООБ развивается преимущественно по Th1-типу, а особенности клиники свидетельствуют о преобладании инфекционного воспаления в генезе клинических симптомов данного варианта ООБ, то особенностью атопического варианта ООБ является его Th2-направленность, приводящая к гиперпродукции IgE. При сравнительной оценке иммуномодулирующих эффектов Ликопида у детей с ООБ атопического и инфекционно-воспалительного патогенетического варианта установлена достоверная позитивная клинико-иммунологическая динамика [7].

Экспериментальная оценка механизмов иммунотропных эффектов ГМДП (Ликопида) при атопиях

В экспериментальной модели аллергии немедленного типа с использованием лабораторных мышей, иммунизированных хроматографически очищенным аллергеном амброзии, показаны достоверные IgE-супрессирующие эффекты ГМДП, введенного на пике продукции гомоцитотропных антител (снижение в 3,6 раза) с сохранением эффекта спустя 15 суток после введения препарата (в 2,2 раза от исходного) [4, 5], что в целом соответствовало результатам клинических наблюдений. Для более детальной оценки причин наблюдаемого ГМДП-индуцированного снижения содержания IgE проведено исследование влияния ГМДП на продукцию мононуклеарами здоровых детей и больных аллергическими заболеваниями IgE, IFN γ , IL-4 в условиях *in vitro* [6]. Анализ полученных результатов позволил установить, что при инкубации мононуклеаров здоровых детей с ГМДП имело место увеличение концентрации IFN γ в супернатанте при выраженной тенденции к снижению содержания IL-4. Гурьяновой С.В. и соавторами (2009) обнаружено, что ГМДП *in vitro* модулирует пролиферацию ФГА- и анти-CD3-стимулированных мононуклеаров как у здоровых доноров, так и у больных БА, и в зависимости от дозы увеличивает продукцию ими IFN γ в 3-8 раз, а у больных БА существенно снижает секрецию IL-4 как интактными, так и митоген-стимулированными мононуклеарами [1]. Обнаруженное под действием ГМДП понижение продукции IL-4 лимфоцитами может служить одним из признаков его влияния на изменение баланса Th1/Th2 в сторону повышения активности Th1. Особо следует отметить, что активность ГМДП реализуется только в отношении активированных (аллергенами или митогенами) лимфоцитов и не проявляется на интактных клетках (не стимулированные мононуклеары здоровых доноров) [1, 4, 10]. Поскольку основной мишенью для ГМДП являются фагоцитирующие

клетки врожденного иммунитета, экспрессирующие внутриклеточный рецептор NOD2, наблюдаемое его влияние на поляризацию Т-хелперов с усилением цитокин-продуцирующей активности Th1 носит опосредованный характер.

Таким образом, полученные клинические данные, свидетельствующие об улучшении состояния больных аллергическими IgE-опосредованными заболеваниями в условиях традиционной терапии с использованием Ликопида, могут быть интерпретированы не только как предотвращение инфекционных осложнений основного заболевания,

но и как патогенетическое воздействие ГМДП, как агониста рецепторов врожденного иммунитета [3], на процесс аллергического воспаления немедленного типа в виде смещения соотношения Th1-\Th2-клеток в сторону Th1 и соответствующего снижения продукции патогенетически значимого IgE. Результаты клинико-экспериментальных исследований ГМДП (Ликопида) при аллергических заболеваниях позволяют предполагать более широкое успешное применение этого препарата в клинике IgE-опосредованных аллергических заболеваний.

Список литературы / References

1. Гурьянова С.В., Козлов И.Г., Мещерякова Е.А., Алексеева Л.Г., Андропова Т.М. Глюкозаминилмурамилдипептид нормализует баланс Th1/Th2 при атопической бронхиальной астме // Иммунология, 2009. № 5. С. 305-308. [Guryanova S.V., Kozlov I.G., Meshcheryakova E.A., Alekseeva L.G., Andronova T.M. Investigation into the influence of glucosaminylmuramyl dipeptide on the normalization of Th1/Th2 balance in patients with atopic bronchial asthma. *Immunologiya = Immunology*, 2009, no. 5, pp. 305-308. (In Russ.)]
2. Ильина Н.И. Эпидемия аллергии — в чем причины? // Российский аллергологический журнал, 2004. № 1. С. 37-41. [Ilyina N.I. Epidemic of allergy – what are the reasons? *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2004, no. 1, pp. 37-41. (In Russ.)]
3. Козлов И.Г., Колесникова Н.В., Воронина Е.В., Гурьянова С.В., Андропова Т.М. Глюкозаминилмурамилдипептид и другие агонисты рецепторов врожденного иммунитета в патогенетической терапии атопических заболеваний // Аллергология и иммунология, 2013. Т. 14, № 4. С. 1-7. [Kozlov I.G., Kolesnikova N.V., Voronina E.V., Guryanova S.V., Andronova T.M. Glucosaminylmuramyl dipeptide and other agonists of innate immunity receptors in the pathogenetic treatment of allergic diseases. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2013, Vol. 14, no. 4, pp. 1-7. (In Russ.)]
4. Колесникова Н.В., Коков Е.А., Андропова Т.М., Гурьянова С.В., Мещерякова Е.А., Кокова Л.Н., Лесик Д.В. Регуляция мурамилдипептидами синтеза иммуноглобулина Е в эксперименте и клинике // Российский аллергологический журнал, 2008. № 5. С. 50-55. [Kolesnikova N.V., Kokov E.A., Andronova T.M., Guryanova S.V., Meshcheryakova E.A., Kokova L.N., Lesik D.V. Regulation by muramyl dipeptides synthesis of immunoglobulin E in the experiment and clinic. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergy Journal*, 2008, no. 5, pp. 50-55. (In Russ.)]
5. Колесникова Н.В., Коков Е.А., Кокова Л.Н., Чудилова Г.А., Андропова Т.М. Нарушения функциональной активности нейтрофилов у детей с атопическим дерматитом и их коррекция ликолипидом // Кубанский научный медицинский вестник, 2008. № 3-4 (102-103). С. 113-117. [Kolesnikova N.V., Kokov E.A., Kokova L.N., Chudilova G.A., Andronova T.M. [Disturbances of the functional activity of neutrophils in children with atopic dermatitis and their correction by lipoic acid. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Research Medical Bulletin*, 2008, no. 3-4 (102-103), pp. 113-117. (In Russ.)]
6. Колесникова Н.В., Коков Е.А., Кокова Л.Н., Чудилова Г.А., Нехотина И.В. Экспериментальная оценка механизмов IgE-супрессирующих эффектов мурамилдипептидов // Кубанский научный медицинский вестник, 2010. № 1 (115). С. 48-51. [Kolesnikova N.V., Kokov E.A., Kokova L.N., Danilov G.A., Nехotina I.V. The experimental study of MDP in modulation of IgE-synthesis. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Research Medical Bulletin*, 2010, no. 1 (115), pp. 48-51. (In Russ.)]
7. Колесникова Н.В., Кокова Л.Н., Коков Е.А., Нехотина И.В., Чудилова Г.А., Ломтатидзе Л.В., Сторожук С.В., Обухова Н.А. Иммуно статус детей с бронхиальной астмой и обструктивным бронхитом, сочетанными с хламидийной инфекцией // Кубанский научный медицинский вестник, 2011. № 2 (125). С. 88-91. [Kolesnikova N.V., Kokova L.N., Kokov E.A., Nехotina I.V., Chudilova G.A., Lomtadze L.V., Storozhuk S.V., Obukhova N.A. Immune status of children with IgE-mediated chronic respiratory diseases, combine with chlamydial infection. *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Research Medical Bulletin*, 2011, no. 2 (125), pp. 88-91. (In Russ.)]
8. Колесникова Н.В., Коков Е.А., Кокова Л.Н. Перспективы использования мурамилдипептидов в лечении аллергических IgE-опосредованных заболеваний // Аллергология и иммунология, 2014. № 4. С. 286-287. [Kolesnikova N.V., Kokov E.A., Kokova L.N. Muramyl dipeptide prospects for the use in the treatment of allergic IgE-mediated diseases. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2014, no. 4, pp. 286-287. (In Russ.)]
9. Мизерницкий Ю.Л. Дифференциальная диагностика и дифференцированная терапия острой бронхиальной обструкции при ОРВИ у детей раннего возраста // Практическая медицина, 2014. № 9. С. 82-88. [Mizernitsky Yu.L. Differential diagnosis and differentiated treatment of acute bronchial obstruction with SARS in infants. *Prakticheskaya meditsina = Practical Medicine*, 2014, no. 9, pp. 82-88. (In Russ.)]

10. Ревякина В.А., Козлов И.Г., Воронина Е.В., Филатова Т.А., Сурков А.Г., Андропова Т.М. Возможно-сти глюкозаминил-мурамилдипептида в лечении атопических заболеваний у детей // Вопросы практической педиатрии, 2009. Т. 4, № 4. С.3-10. [Revyakina V.A., Kozlov I.G., Voronina E.V., Filatova T.A., Surkov A.G., Andronov T.M. Features muramyl-dipeptide glucosamine in the treatment of atopic diseases in children. *Voprosy prakticheskoy pediatrii = Problems of Practical Pediatrics*, 2009, Vol. 4, no. 4, pp. 3-10. (In Russ.)]
11. Хаитов Р.М., Кубанова А.А. Атопический дерматит: рекомендации для практических врачей // Российский национальный согласительный документ по атопическому дерматиту. М.: Фармарус Принт, 2002. 192 с. [Khaitov R.M., Kubanova A.A. Atopic dermatitis: advice to practitioners. Russian national conciliation document on atopic dermatitis]. Moscow: Farmarus Print, 2002. 192 p.
12. Хаитов Р.М. Главная мишень иммуномодулирующего действия ГМДП (ликопида) // Иммунология, 1994. № 2. С. 47-50. [Khaitov R.M. The main target of immunomodulatory effects GMDP (licopid). *Immunologiya = Immunology*, 1994, no. 2, pp. 47-50. (In Russ.)]
13. Хутуева С.Х., Федосеева В.Н. Аллерген-специфическая иммунотерапия бронхиальной астмы. М.: Экон, 2000. 252 с. [Hutueva S.X., Fedoseyeva V.N. Allergen-specific immunotherapy of asthma]. Moscow: Ekon, 2000. 252 p. (In Russ.)]
14. Boniface S., Koscher V., Mamessier E. Assessment of T-lymphocyte cytokine production in induced sputum from asthmatics: a flow cytometry study. *Clin. Exp. Allergy*, 2003, no. 33, pp. 1238-1243.
15. Global Strategy for Asthma Management and Prevention "Global Initiative for Asthma (GINA)" Update. 2015.
16. Irifune K., Yokoyama A., Sakai K., Watanabe A., Katayama H., Ohnishi H., Hamada H., Nakajima M., Kohno N., Higaki J. Adoptive transfer of T-helper cell type 1 clones attenuates an asthmatic phenotype in mice. *Eur. Respir. J.*, 2005, no. 25, pp. 653-659.
17. Khanferyan R., Kolesnikova N., Lesik D., DuBuske L.M. The role of NOD-2 Receptors in Modulation of IgE-synthesis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2008, no. 9, p. 4.
18. Martinez F.D. Development of wheezing disorders and asthma in preschool children. *Pediatrics*, 2002, Vol. 109, pp. 362-367.
19. Meshcheryakova E.A., Makarov E.A., Philpott D.J., Andronova T.M., Ivanov V.T. Evidence for correlation between the intensities of adjuvant effects and NOD2 activation by monomeric, dimeric and lipophilic derivatives of N-acetylglucosaminyl-N-acetylmuramyl peptides. *Vaccine*, 2007, no. 25, pp. 4515-4520.
20. Valacer D.J. Childhood asthma: causes, epidemiological factors and complications. *Drugs*, 2000, Vol. 59, pp. 43-45.

Автор:

Колесникова Н.В. — д.б.н., профессор кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС, заведующая ЦНИЛ ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Козлов И.Г. — д.м.н., профессор, вице-президент Российского научного общества иммунологов, заведующий лабораторией экспериментальной иммунологии и иммунофармакологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева; заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Гурьянова С.В. — к.б.н., лаборатория химии пептидов, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Кокков Е.А. — к.м.н., доцент кафедры клинической иммунологии, аллергологии и лабораторной диагностики ФПК и ППС ГБОУ ВПО «Кубанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Краснодар, Россия

Андропова Т.М. — к.х.н., президент ЗАО «Пептек», Москва, Россия

Author:

Kolesnikova N.V., PhD, MD (Biology), Professor, Department of Clinical Immunology, Allergy and Laboratory Diagnosis of FPC and PPS, Head of Central Research Laboratory, Kuban State Medical Academy, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation

Kozlov I.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Vice-President of Russian Society of Immunology, Head, Laboratory of Experimental Immunology and Immunopharmacology, Federal D. Rogachev Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Head, Department of Pharmacology, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Guryanova S.V., PhD (Biology), Laboratory of Peptide Chemistry, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kokov E.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Clinical Immunology, Allergy and Laboratory Diagnosis of FPC and PPS, Kuban State Medical Academy, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnodar, Russian Federation

Andronova T.M., PhD (Chemistry), President, CJSC Peptek, Moscow, Russian Federation

Поступила 23.10.2015

Отправлена на доработку 09.11.2015

Принята к печати 10.12.2015

Received 23.10.2015

Revision received 09.11.2015

Accepted 10.12.2015

ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ ФАГОЦИТОВ КРОВИ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ЛЕГКИХ

Бердюгина О.В., Ершова А.В.

*ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства
здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия*

Резюме. Ведущая роль фагоцитов в противостоянии *Mycobacterium tuberculosis* установлена. Различные варианты течения туберкулезного воспалительного процесса актуализируют необходимость изучения их функционально-метаболических особенностей у больных с разными формами туберкулеза легких, что явилось целью данного исследования. Обследовано 124 человека, из которых 25 были практически здоровыми людьми, а 99 имели один из трех вариантов туберкулезного воспалительного процесса: 31 – ограниченный специфический – туберкулема, 44 – инфильтративный туберкулез легких, 24 – фиброзно-кавернозный туберкулез легких. Оценивали маркеры активации нейтрофилов и моноцитов (phagotest, bursttest – продукцию супероксид-аниона, CD11b⁺, CD11c⁺, HLA-DR-Ag), а также основные показатели клеточного иммунитета (CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD19⁺, CD45⁺CD3⁺CD16⁺56⁺). Статистическая обработка проведена в среде «Microsoft Office Excel 2007» и «Statistica for Windows v. 6.1». Установлено выраженное снижение доли моноцитов, способных к генерации супероксид-аниона, которое составляло 10,1% при фиброзно-кавернозном туберкулезе в сравнении с пациентами, имеющими туберкулема и инфильтративный туберкулез. Также при фиброзно-кавернозном туберкулезе была повышена экспрессия маркеров адгезии CD11b – в среднем на 49,0% и CD11c – на 73,5% в сравнении с вышеописанными группами больных. Выявлен факт большего снижения поглотительной функции гранулоцитов у больных с активными формами туберкулеза, в сравнении с ограниченными (туберкулема) вариантами патологического процесса. Фиброзно-кавернозный туберкулез сопровождался повышением абсолютного числа гранулоцитов, вырабатывающих как супероксид-анион, так и экспрессирующих CD11b⁺ и CD11c⁺. Выяснено, что снижение количества лимфоцитов у больных с туберкулемами носило относительный характер и соответствовало росту количества гранулоцитов и моноцитов в периферической крови пациентов. Проведенное исследование позволило установить, что каждая форма туберкулезного воспалительного процесса характеризуется индивидуальной «картиной» иммунологических изменений. У больных с туберкулемами отмечается снижение фагоцитарной и функционально-метаболической активности моноцитов, на гранулоцитах увеличивается количество молекул адгезии 11b и 11c, выявляется увеличение числа Т-лимфоцитов, снижение числа НК-клеток. Инфильтратив-

Адрес для переписки:

*Бердюгина Ольга Викторовна
ФГБУ «Уральский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии» Министерства
здравоохранения РФ
620039, Россия, г. Екатеринбург, ул. XXII партсъезда, 50.
Тел./факс: 8 (343) 333-44-66.
E-mail: berolga73@rambler.ru*

Address for correspondence:

*Berdyugina Olga V.
Ural Research Institute of Phthiopulmonology, Ministry of
Healthcare of the Russian Federation
620039, Russian Federation, Yekaterinburg,
XXII Partysjezd str., 50.
Phone/Fax: 7 (343) 333-44-66.
E-mail: berolga73@rambler.ru*

Образец цитирования:

*О.В. Бердюгина, А.В. Ершова, «Функционально-
метаболические особенности фагоцитов крови при
разных формах туберкулезного воспалительного процесса
легких» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1.
С. 21-32. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-21-32*

© Бердюгина О.В., Ершова А.В., 2016

For citation:

*O.V. Berdyugina, A.V. Yershova, “Functional and metabolic
features of blood phagocytes at different forms of tubercular
inflammatory process of lungs”, Medical Immunology (Russia)
/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 21-32.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-21-32*

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-21-32>

ный туберкулез сопровождается ростом популяции моноцитов с повышением на них экспрессии HLA-DR, гранулоциты характеризуются усилением экспрессии молекул адгезии 11b⁺ и 11c⁺, число Т-лимфоцитов снижается. При фиброзно-кавернозном туберкулезе наблюдается лейкоцитоз, моноцитоз, гранулоцитоз. Основными функциональными особенностями моноцитов при данной форме туберкулезного воспалительного процесса становится значительное число клеток, экспрессирующих на своей поверхности молекулы адгезии 11b⁺ и 11c⁺, функционально-метаболическая активность гранулоцитов, а также популяция клеток, экспрессирующих CD11b⁺ увеличивается, отмечается рост числа В-клеток.

Ключевые слова: моноциты, гранулоциты, фагоцитоз, молекулы адгезии, супероксид-анион, HLA-DR, туберкулез легких

FUNCTIONAL AND METABOLIC FEATURES OF BLOOD PHAGOCYTES AT DIFFERENT FORMS OF TUBERCULAR INFLAMMATORY PROCESS OF LUNGS

Berdyugina O.V., Yershova A.V.

Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. A leading role of phagocytes in prevention of *M. tuberculosis* infection is well established. Various clinical variants of tubercular inflammatory process necessitate further studies of functional and metabolic features of blood phagocytes in the patients with different forms of lung tuberculosis, being the main goal of this study. We have observed a total of 124 persons including 25 healthy subjects, and 99 patients with tuberculosis who manifested with different types of tubercular inflammatory process, i.e., 31 patients had a limited specific process (tuberculoma); in 44 patients, an infiltrative lung tuberculosis was diagnosed, and 24 patients had fibro-cavernous tuberculosis of lungs. We studied activation markers of neutrophils and monocytes (phagotest, burst-test, CD11b⁺, CD11c⁺, HLA-DR-Ag), as well as main indicators of cellular immunity (CD45⁺CD3⁺, CD45⁺CD19⁺, CD45⁺CD3⁺CD16⁺56⁺). Statistical evaluation was carried out in the «Microsoft Office Excel 2007» and «Statistica for Windows v. 6.1» environment. A considerable decrease in proportion of superoxide anion-producing monocytes was found in 10% of the patients with fibro-cavernous tuberculosis as compared to the patients with tuberculoma and infiltrative tuberculosis. Similarly, the fibro-cavernous tuberculosis was characterized by higher expression of adhesion markers, e.g., CD11b, by 49%, and CD11c, by 73.5%, when compared with the two other groups of patients.

A considerable decrease of absorbing granulocyte function was found in the patients with active forms of tuberculosis, as compared with limited clinical forms (tuberculoma). Fibro-cavernous tuberculosis was associated with increased absolute numbers of granulocyte that produce both superoxide anion, and express surface CD11b⁺ and CD11c⁺. We have revealed a relative decrease in lymphocyte quantities in the patients from tuberculoma which corresponded to increased granulocyte quantities of granulocytes and monocytes in the patients' blood. The conducted study allowed us to make a conclusion that each clinical form of tuberculosis is characterized by a specific immunological pattern.

In the patients with tuberculoma, we have revealed a decrease of phagocytic, functional and metabolic activities of monocytes is noted, along with increased quantities of CD11b⁺ and CD11c⁺ adhesion molecules on granulocytes, increased numbers of T-lymphocytes, and decreased amounts of NK-cells. Infiltrative tuberculosis is characterized by increased contents and higher HLA-DR expression of the monocytes, with enhanced expression of CD11b⁺ and CD11c⁺ adhesion molecules on the granulocytes, and decreased number of T-lymphocytes. In the fibro-cavernous tuberculosis we observed leukocytosis, monocytosis, granulocytosis. The main functional feature of this clinical form is an increased amount of CD 11b⁺ and CD 11c⁺-bearing leukocytes, higher functional and metabolic activity of granulocytes, as well as expansion of CD11b⁺ expressing cell population and increased numbers of B-cells in peripheral blood.

Keywords: monocytes, granulocytes, phagocytosis, adhesion molecules, superoxide-anion, HLA-DR, lung tuberculosis

Введение

Известно, что в организме человека основную роль в борьбе с *Mycobacterium tuberculosis* играют фагоциты [6, 9, 17]. Это обусловлено тем, что при нарушении слияния фагосомы и лизосомы внутри макрофага, вызванного инфицированием, происходит изменение фагоцитарных реакций с трансформацией «процессинга» [11, 12, 18]. Следствием последнего становится отмена презентации антигена другим клеткам иммунной системы [3, 8]. Отсутствие классического иммунного ответа на внедрение патогена позволяет ему длительное время выживать интрацеллюлярно, используя макрофаг в качестве защитника, что и приводит к развитию туберкулеза [7, 20].

Известно, что исход взаимодействия макроорганизма и *M. tuberculosis* может быть различным: от заболевания в острой или хронической форме до выздоровления, и это в значительной степени зависит от иммунологической реактивности пациента [1, 5]. При хроническом процессе в месте массивной гибели пораженных фагоцитов наблюдается формирование гранулемы, как способа, выработанного иммунной системой для ограничения дальнейшей диссеминации патогена [10]. В том случае, когда ее формирование оказывается недостаточным, может развиваться диссеминированный туберкулез, что значительно ухудшает прогноз заболевания и затрудняет лечение [14, 15]. Сравнительная оценка иммунологических показателей у больных разными формами туберкулезного воспалительного процесса: при наличии сформированного отграниченного специфического процесса – туберкулемы [16], у пациентов с преимущественно экссудативным характером процесса – инфильтративным туберкулезом легких [13], а также у больных фибринозно-кавернозным туберкулезом (ФКТ) легких [2] позволяет выявить комплекс реакций, характеризующих результат взаимодействия иммунной системы организма и патогена в разных условиях [4, 19].

Целью данной работы стало изучение функционально-метаболических особенностей фагоцитов крови у больных с разными формами туберкулезного воспалительного процесса легких.

Материалы и методы

Работа основана на анализе клинико-лабораторных данных 124 человек, из которых 99 были пациентами ФГБУ «УНИИФ» Министерства здравоохранения РФ (директор – д.м.н. С.Н. Скорняков), 25 – практически здоровыми людьми. Медицинскую помощь больным, принявшим участие в исследовании, оказывали с 2011 по 2013 годы в отделениях лечения боль-

ных туберкулезом легких (заведующая – Г.Е. Залетаева), лечения туберкулезом легких с множественной лекарственной устойчивостью – МЛУ (заведующая – к.м.н. Е.И. Кильдюшева), туберкулезного легочно-хирургического отделения (заведующие – П.Ф. Гапонюк, с 2013 года – к.м.н. А.В. Неретин). Критериями включения в исследование были: возраст от 18 до 55 лет, отрицательные клинико-лабораторные данные наличия вирусных гепатитов В, С, вируса иммунодефицита человека. Критериями исключения стали: отказ больного от участия в исследовании, для контрольной группы – наличие любых острых или хронических заболеваний. Клинико-рентгенологический статус пациента устанавливался при поступлении его в учреждение и на этапах лечения в соответствии со стандартом оказания медицинской помощи больным туберкулезом (Приказ Минздравсоцразвития РФ № 572 «Об утверждении стандарта медицинской помощи больным туберкулезом» от 21.07.2006 г.). Больные туберкулезом имели один из трех вариантов туберкулезного воспалительного процесса. Первая группа была представлена 31 пациентом, больным туберкулезом легких с формированием ограничения специфического процесса – туберкулемы, в том числе вызванной лекарственно устойчивыми изолятами *M. tuberculosis*. Средний возраст обследованных составил $32,4 \pm 1,6$ года, из них 18 мужчин (58%) и 13 (42%) женщины. Сопутствующая патология встречалась у 18 больных (58%). Вторая группа была представлена 44 больным с преимущественно экссудативным характером процесса – инфильтративным туберкулезом легких – средний возраст которых составлял $35,4 \pm 4,6$ года. В этой группе 26 пациентов (59,1%) были мужчины, 18 (40,9%) – женщины. Сопутствующая патология встречалась у 35 больных (79,5%). В третью группу вошли 24 больных ФКТ легких, возбудители заболевания были либо с МЛУ, либо с широкой лекарственной устойчивостью к 3–7 противотуберкулезным препаратам. Их средний возраст составил $33,6 \pm 2,0$ года. В этой группе 17 (70,8%) пациентов были мужчины, 7 (29,2%) – женщины. Четвертая группа была контрольной и состояла из 25 человек. Их средний возраст был 36,0 лет, 60% группы были мужчины, 40% – женщины. Кровь для исследования забиралась у обследуемых при поступлении в стационар до начала лечения однократно. Для оценки маркеров активации нейтрофилов и моноцитов, а также основных показателей клеточного иммунитета использовалась цельная кровь с антикоагулянтом K_3 ЭДТА в концентрации 1,6 мг/мл, для определения фагоцитарной активности клеток – кровь с гепарином лития в концентрации 16 МЕ/мл. Общий анализ крови выполнялся

на гематологическом анализаторе 5 Diff Mythic 22 AL (Cormay, Poland). Поглотительная способность нейтрофилов и моноцитов оценивалась методом проточной цитофлуориметрии на приборе COULTER®Epics®XL (Beckman Coulter, USA) с использованием набора Phagotest (Glycotope Biotechnology, Germany), метаболическая активность – с использованием тест-системы Bursttest (Glycotope Biotechnology, Germany). Хемотаксическую функцию фагоцитов определяли по экспрессии на моноцитах и нейтрофилах маркеров молекул адгезии CD11b⁺ и CD11c⁺, антиген-презентирующую функцию – по экспрессии HLA-DR-Ag. Дополнительно изучали основные субпопуляции лимфоцитов, используя моноклональные антитела фирмы Beckman Coulter (USA). Лизис эритроцитов осуществляли с помощью станции пробоподготовки Coulter® Q-Prep (Beckman Coulter, USA) и реагентов Immunoprep одноименной компании. Контроль качества проводили при помощи калибровочных частиц Flow Check. Для детекции лейкоцитов использовали линейный дифференцировочный маркер CD45⁺. Подсчитывали общее количество Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺), В-лимфоцитов (CD45⁺CD19⁺) и NK-клеток (CD45⁺CD3⁻CD16⁺56⁺). Статисти-

ческая обработка данных проведена с использованием программ «Microsoft Office Excel 2007» и «Statistica for Windows v. 6.1». Проверку гипотезы о нормальном распределении, а также о согласии ее с распределением генеральной совокупности выполняли, используя χ^2 Пирсона. Для оценки полученных результатов были использованы непараметрические методы. Вычислялись: среднее арифметическое значение величины (M), среднее квадратическое отклонение (σ), статистическая медиана (Me), минимальное (Min), максимальное значение (Max). Оценку значимости различий между выборками проводили попарно, применяли критерий U Манна–Уитни. При величине $p < 0,05$ нулевая гипотеза (отсутствие отличий между выборками) отвергалась, и статистические различия между группами считались значимыми.

Результаты

Изучение популяционного состава и функционально-метаболических особенностей моноцитов, предшественников тканевых макрофагов, у больных различными формами туберкулезного воспалительного процесса показало нижеследующее. Абсолютное и относительное количество

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ МОНОЦИТОВ БОЛЬНЫХ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФОРМЫ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА

Исследуемые показатели	Единицы измерения	Контрольная группа, n = 25	Больные с туберкулезом легкого, n = 31	Больные инфильтративным туберкулезом легкого, n = 45	Больные ФКТ легкого, n = 24
Моноциты	10 ⁹ /л	0,41 ¹ (0,28-0,54) ² 0,16 ³ 0,75 ⁴ 0,40 ⁵	0,52 (0,36-0,68) 0,26 0,86 0,48	0,54 (0,29-0,80) 0,17 1,18 0,51 *p < 0,05	0,64 (0,24-1,05) 0,14 1,98 0,52 *p < 0,05
	%	6,9 (4,5-9,3) 2,0 11,0 7,0	7,3 (4,5-10,1) 4,0 15,0 7,0	8,5 (5,3-11,73) 3,0 17,0 8,0	8,2 (5,6-10,8) 4,0 14,0 8,0
Фагоцитирующие моноциты (Phago test)	10 ⁹ /л	0,33 (0,20-0,45) 0,17 0,69 0,29	0,28 (0,17-0,39) 0,11 0,65 0,26 *p < 0,05	0,31 (0,13-0,50) 0,07 1,04 0,28	0,33 (0,18-0,48) 0,14 0,65 0,30
	%	73,9 (66,5-81,3) 58,7 90,2 75,3	57,0 (37,8-76,1) 22,0 99,0 57,9 *p < 0,05	51,8 (37,9-66,1) 23,5 78,8 52,2 *p < 0,05	50,2 (33,1-67,3) 19,6 76,2 53,2 *p < 0,05

Таблица 1 (окончание)

Исследуемые показатели	Единицы измерения	Контрольная группа, n = 25	Больные с туберкулезом легкого, n = 31	Больные инфильтративным туберкулезом легкого, n = 45	Больные ФКТ легкого, n = 24
Моноциты, продуцирующие супероксид-анион O ₂ ⁻ (Burst test)	10 ⁹ /л	0,35 (0,22-0,48) 0,20 0,71 0,32	0,28 (0,16-0,40) 0,06 0,45 0,31 *p < 0,05	0,32 (0,13-0,51) 0,12 0,98 0,28	0,31 (0,12-0,51) 0,07 1,00 0,26
	%	76,0 (65,5-86,5) 55,2 91,7 79,0	58,6 (34,5-82,7) 12,0 94,0 65,7 *p < 0,05	57,4 (42,1-72,7) 22,1 86,6 59,0 *p < 0,05	52,7 (35,5-70,0) 24,3 86,8 53,4 *p < 0,05
CD14 ⁺ CD11b ⁺	10 ⁹ /л	0,38 (0,26-0,50) 0,21 0,65 0,35	0,49 (0,32-0,63) 0,32 0,79 0,43	0,50 (0,23-0,77) 0,17 1,13 0,46	0,73 (0,21-1,24) 0,30 1,97 0,58 *p < 0,05
	%	92,8 (84,9-100,0) 79,7 99,9 97,5	96,8 (94,9-98,7) 93,9 99,0 97,1	94,2 (84,2-100,0) 64,4 99,9 98,5	94,4 (87,6-100,0) 79,9 99,8 97,9
CD14 ⁺ CD11c ⁺	10 ⁹ /л	0,31 (0,18-0,43) 0,12 0,57 0,30	0,34 (0,21-0,47) 0,22 0,56 0,30	0,39 (0,18-0,61) 0,14 0,99 0,32	0,59 (0,10-1,09) 0,20 1,94 0,36 *p < 0,05
	%	72,8 (55,6-90,0) 46,1 96,7 70,4	69,1 (53,0-85,1) 47,0 91,2 67,4	74,8 (57,3-92,3) 42,1 99,5 73,0	77,9 (60,9-94,9) 51,4 97,9 78,5
CD14 ⁺ HLA-DR ⁺	10 ⁹ /л	0,089 (0,033-0,145) 0,002 0,190 0,089	0,082 (0,004-0,161) 0,007 0,221 0,047 *p < 0,05	0,135 (0,021-0,248) 0,009 0,420 0,098 *p < 0,05	0,090 (0,00-0,188) 0,017 0,322 0,044 ***p < 0,05
	%	23,3 (8,1-38,4) 0,4 52,0 24,1	16,7 (0,5-32,9) 1,3 46,7 12,0	20,2 (9,5-30,9) 1,7 42,7 18,6	11,5 (3,0-20,0) 3,6 31,7 8,5 *p < 0,05 ***p < 0,05

Примечание. 1 – M, 2 – M±σ, 3 – Min, 4 – Max, 5 – Me, *p – в сравнении с контрольной группой, **p – в сравнении с группой больных инфильтративным туберкулезом.

изучаемых клеток было увеличено у больных с туберкулемами в сравнении с практически здоровыми людьми несущественно, в других случаях более значимо, в частности: при инфильтративном туберкулезе – на 31,7% ($p < 0,05$), при ФКТ – на 56,1% ($p < 0,05$) – таблица 1.

Между группами обследованных больных достоверных различий выявлено не было, однако при ФКТ общее число моноцитов было заметно выше, чем при других формах туберкулеза: на 23,1% и 18,0% в сравнении с числом этих клеток у больных с туберкулемами и инфильтративным туберкулезом соответственно.

Абсолютное число моноцитов, проявляющих фагоцитарную активность, по результатам нашего исследования, у больных инфильтративным и ФКТ легких не имело значимых отличий от показателей здоровых лиц. У пациентов с туберкулемами популяция этих клеток была снижена на 15,2% ($p < 0,05$). Вместе с тем относительное количество фагоцитирующих моноцитов было снижено у всех больных: при туберкулемах – на 22,9% ($p < 0,05$), при инфильтративном туберкулезе – на 29,9%, при ФКТ – на 32,1% относительно того же показателя в группе сравнения. Во всех случаях это снижение носило достоверный характер. Различие в количестве этих клеток между группами больных было менее существенным: в сравнении с ограниченными формами туберкулеза (туберкулема) при инфильтративном туберкулезе и ФКТ показатель поглотительной способности моноцитов был снижен на 9,1% и 11,9% соответственно.

Метаболическая активность моноцитов имела следующие особенности. Абсолютное количество клеток, продуцирующих супероксид-анион, не имело значимых отличий от значений в контрольной группе у больных инфильтративным и ФКТ легких, вместе с тем у пациентов с туберкулемами популяция этих клеток была снижена на 20,0% ($p < 0,05$). Относительное число этих клеток изменялось синхронно показателям поглотительной активности, а именно – достоверно снижалось во всех исследуемых группах в сравнении с контролем: при туберкулемах это понижение составило 22,9% ($p < 0,05$), при инфильтративном туберкулезе – 24,5% ($p < 0,05$), при ФКТ – 30,7% ($p < 0,05$).

Изучение экспрессии комплементсвязывающего интегрин CD11b на моноцитах показало, что количество несущих клеток было увеличено в сравнении с контролем и в абсолютном и в относительном выражении во всех исследуемых группах пациентов, однако достоверных величин данное различие достигало только в группе больных с ФКТ. Число CD11b-экспрессирующих

моноцитов у пациентов этой группы было в 1,9 раза выше, чем в контрольной группе.

Что касается экспрессии другой молекулы адгезии – интегрин αX (CD11c), то и в этом случае мы наблюдали сходную картину: у больных с впервые выявленным туберкулезом легких с формированием ограниченного специфического процесса – туберкулемы – число моноцитов, экспрессирующих интегрин αX , отличалось от контрольной группы незначительно, при инфильтративном туберкулезе – немного повышалось, а у пациентов с ФКТ абсолютное количество этих клеток было в 1,9 раза выше, чем в группе практически здоровых людей (различие было статистически достоверным). Существенных различий между пациентами с такими формами туберкулезного воспалительного процесса, как туберкулема и инфильтративный туберкулез, в экспрессии молекул адгезии на моноцитах обнаружено не было. Группа больных ФКТ отличалась от двух других групп больных с туберкулезным воспалительным процессом повышенной экспрессией обоих маркеров адгезии: CD11b – в среднем на 49,0%, CD11c – на 73,5%.

Антигенпрезентирующая функция моноцитов (по данным экспрессии HLA-DR-антигена) у больных с туберкулемами и ФКТ была снижена в сравнении с контрольной группой, соответственно, на 28,3% и 25,3% ($p < 0,05$). Экссудативное воспаление, наблюдавшееся при инфильтративном туберкулезе, сопровождалось значительным увеличением количества моноцитов, экспрессирующих HLA-DR-антиген. Популяция этих клеток в крови была увеличена в 1,5 раза в сравнении с контрольной группой ($p < 0,05$).

Изучение популяции гранулоцитов позволило выявить следующие особенности для больных с разными формами туберкулезного воспалительного процесса (табл. 2).

Общее количество исследуемых клеток было несколько повышено у больных с туберкулемами и инфильтративным туберкулезом, при ФКТ повышение числа клеток было более значимым и достоверным: их количество в 1,6 раза превышало значения контрольной группы. Между группами значимых отличий отмечено не было, однако наблюдалась тенденция к гранулоцитозу у пациентов с ФКТ в сравнении с больными, имеющими туберкулемы (в среднем на 35,0%).

Абсолютное количество фагоцитирующих гранулоцитов не имело значимых отличий от данных контрольной группы при всех изученных формах туберкулеза легких, однако относительное число этих клеток было снижено у больных с туберкулемами – на 8,5%. При инфильтративном и ФКТ снижение этого показателя было более значимым и составляло 16,8% и 15,9%, соответственно, от-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ФУНКЦИОНАЛЬНО-МЕТАБОЛИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ГРАНУЛОЦИТОВ БОЛЬНЫХ ПРИ РАЗНЫХ ФОРМАХ ТУБЕРКУЛЕЗНОГО ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА ЛЕГКИХ

Исследуемые показатели	Единицы измерения	Контрольная группа, n = 25	Больные с туберкулемами легкого, n = 31	Больные инфильтративным туберкулезом легкого, n = 45	Больные ФКТ легкого, n = 24
Гранулоциты	10 ⁹ /л	3,49 ¹ (2,14-4,83) ² 1,91 ³ 6,21 ⁴ 3,39 ⁵	4,12 (2,83-5,40) 1,76 6,94 4,25	4,28 (2,22-6,35) 0,66 10,07 3,76	5,56 (2,81-8,31) 2,51 14,09 4,84 *p < 0,05
	%	58,8 (48,3-69,3) 41,0 80,0 60,8	59,4 (50,5-68,3) 40,0 75,0 60,0	62,1 (51,6-72,6) 29,0 79,0 62,5	66,4 (56,6-76,2) 44,0 87,0 67,0
Фагоцитирующие гранулоциты (Phago test)	10 ⁹ /л	3,41 (1,81-5,01) 1,53 7,08 2,99	3,51 (2,15-4,87) 0,73 5,86 3,72	3,28 (1,69-4,87) 0,60 6,27 3,05	3,75 (2,07-5,42) 1,53 8,37 3,57
	%	88,9 (82,7-95,0) 72,7 97,6 89,3	81,3 (64,5-98,2) 38,0 99,7 87,6	74,0 (55,2-92,8) 28,8 96,9 80,0 *p < 0,05	74,8 (55,1-94,4) 30,0 95,6 77,9 *p < 0,05
Гранулоциты, продуцирующие супероксид-анион (Burst test)	10 ⁹ /л	3,57 (1,82-5,32) 1,75 8,45 3,14	3,21 (1,44-4,98) 0,67 6,58 3,07	3,74 (1,62-5,86) 0,45 9,88 3,23	5,10 (2,50-7,70) 2,15 12,78 4,25 **p < 0,05
	%	95,0 (88,7-100,0) 72,3 99,6 97,0	79,0 (53,1-100,0) 26,7 99,4 94,8 *p < 0,05	86,3 (65,4-100,0) 23,1 98,9 94,9 *p < 0,05	91,6 (78,9-100,0) 35,9 98,5 94,8 **p < 0,05
CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11b ⁺	10 ⁹ /л	3,18 (1,60-4,76) 1,61 6,20 2,91	4,52 (3,29-5,74) 2,33 5,81 4,70	4,46 (2,29-6,62) 1,82 10,04 4,61	5,58 (2,56-8,59) 2,48 13,65 5,48 *p < 0,05
	%	95,4 (87,6-100,0) 71,0 99,9 98,7	93,0 (80,7-100,0) 68,8 99,7 99,4	92,0 (80,7-100,0) 67,0 99,9 98,5	98,2 (96,1-100,0) 93,2 99,8 99,4 ***p < 0,05

Исследуемые показатели	Единицы измерения	Контрольная группа, n = 25	Больные с туберкулемами легкого, n = 31	Больные инфильтративным туберкулезом легкого, n = 45	Больные ФКТ легкого, n = 24
CD14 ⁺ CD13 ^{low} CD11c ⁺	10 ⁹ /л	0,67 (0,01-1,32) 0,05 2,09 0,36	1,08 (0,00-2,25) 0,01 3,23 0,43	1,09 (0,00-2,19) 0,03 3,64 0,61	1,85 (0,33-3,37) 0,36 5,17 1,40 *p < 0,05
	%	17,1 (6,0-28,2) 2,4 37,6 14,5	22,1 (0,6-43,5) 0,1 58,6 11,5	20,5 (4,8-36,2) 2,3 49,0 11,6	32,5 (12,4-52,6) 7,5 69,1 29,5 *p < 0,05 **p < 0,05 ***p < 0,05
CD14 ⁺ CD13 ^{low} HLA-DR ^{low}	10 ⁹ /л	0,004 (0,000-0,016) 0,000 0,046 0,000	0,003 (0,000-0,007) 0,000 0,009 0,004	0,007 (0,000-0,015) 0,000 0,030 0,004	0,007 (0,000-0,018) 0,000 0,033 0,004
	%	0,14 (0,00-0,48) 0,00 1,30 0,00	0,08 (0,00-0,15) 0,00 0,20 0,10 *p < 0,05	0,13 (0,00-0,26) 0,00 0,40 0,10	0,14 (0,00-0,33) 0,00 0,50 0,10

Примечание. 1-M, 2-M±σ, 3-Min, 4-Max, 5-Me, *p – в сравнении с контрольной группой, **p – в сравнении с группой больных с туберкулемами, ***p – в сравнении с группой больных инфильтративным туберкулезом.

носителем данных здоровых людей; в этих двух группах отличие от контроля было достоверным.

Функционально-метаболическая активность гранулоцитов, оцениваемая по способности к окислительному взрыву, у больных туберкулезом легких, с формированием ограничения специфического процесса – туберкулемы, а также у пациентов с инфильтративным туберкулезом легких, была сходной с данным у здоровых лиц, тогда как у больных ФКТ легких она была повышена на 42,9% (p < 0,05). При этом доля гранулоцитов, продуцирующих активные формы кислорода, от общего числа этих клеток была снижена в группе больных с туберкулемами и инфильтративным туберкулезом легких на 16,8% и 9,2%, соответственно, по сравнению с группой здоровых людей. Данные эти носили статистически достоверный характер. При ФКТ снижение количества этих клеток было незначительным (всего на 3,6%) и статистически недостоверным, вместе с тем тенденция к снижению также отмечалась. В частности, у пациентов с ФКТ значительно чаще встречались значения ниже нормы (85-90%), чем в контрольной группе. Наименьшая величина отмеченная у больного с ФКТ была

35,9% клеток, тогда как в контрольной группе – 72,3%. Существенные отличия выявлены также между группами: установлено, что при ФКТ количество метаболически-активных гранулоцитов достоверно превышало этот показатель у пациентов с ограниченными формами туберкулеза легких (туберкулемы) – на 58,9% в абсолютных значениях и на 15,9% – в относительных.

Абсолютное количество гранулоцитов, экспрессирующих CD11b⁺ у всех изученных больных было выше, чем в группе здоровых людей: при туберкулемах и инфильтративном туберкулезе на 42,1% и 40,3%, соответственно, в сравнении с контролем, а при ФКТ достигало статистически значимых величин в сравнении с группой здоровых лиц и составляло 75,5%. В последней группе количество CD11b⁺гранулоцитов превышало значения больных с туберкулемами и инфильтративным туберкулезом на 23,5% и 25,1% соответственно. Необходимо отметить, что большая часть гранулоцитов экспрессирует молекулу CD11b, которая является рецептором для фрагмента iC3b третьего компонента комплемента. Вместе с тем при инфильтративном туберкулезе доля таких клеток была минимальной (в сред-

нем 92%), при ФКТ – максимальной (в среднем 98,2%). Различие между этими двумя группами составило 6,7% и было статистически достоверным.

Изучение экспрессии молекулы CD11c на гранулоцитах показало сходную с интегринном α M (CD11b) закономерность. Туберкулемы и инфильтративный туберкулез сопровождались увеличением количества гранулоцитов, экспрессирующих белок CD11c на своей поверхности, в данном случае в 1,6 раза в сравнении с контрольной группой. ФКТ характеризовался достоверным повышением CD11c на гранулоцитах в 2,8 раза в сравнении со здоровыми людьми. Значимые различия между группами также были выявлены. У больных с ФКТ количество гранулоцитов, экспрессирующих CD11c, было на 71,3% выше, чем у пациентов с инфильтративным туберкулезом и туберкулемами ($p < 0,05$).

Экспрессия HLA-DR-Ag⁺ на гранулоцитах была крайне неравномерной. В контрольной группе разброс количества этих клеток составил от 0 до $0,046 \times 10^9$ /клеток на литр, у подавляющего числа обследованных активированных клеток обнаружено не было. Среднее их количество

увеличивалось при инфильтративном туберкулезе и ФКТ в сравнении с контрольной группой (на 75%) и группой больных туберкулемами (в 1,3 раза), однако различия не были статистически достоверными. Доля гранулоцитов, экспрессирующих HLA-DR-Ag, от общего числа гранулоцитов была снижена при туберкулемах относительно всех остальных изученных групп на 42,9%.

Дополнительно, для оценки клеточного звена иммунной системы, изучили соотношение основных субпопуляций лимфоцитов (табл. 3). Было установлено, что абсолютное число лимфоцитов варьировало во всех изученных группах в пределах статистической достоверности, тогда как относительное их число снижалось во всех трех группах больных туберкулезом: при туберкулемах незначительно, при инфильтративном туберкулезе на 14,6%, и при ФКТ это снижение уже было достоверным и достигло 25,9% в сравнении с контрольной группой. При ФКТ различие было достоверным не только в сравнении с группой здоровых людей, но и с больными туберкулемами – оно составило 23,3%. Несмотря на отсутствие выявленных достоверных отличий, обращает на себя внимание фактическое раз-

ТАБЛИЦА 3. ОСНОВНЫЕ ПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ ОБСЛЕДОВАННЫХ ПАЦИЕНТОВ

Исследованные показатели	Единицы измерения	Контрольная группа, n = 25	Больные с туберкулемами легкого, n = 31	Больные инфильтративным туберкулезом легкого, n = 45	Больные ФКТ легкого, n = 24
Лимфоциты	10 ⁹ /л	2,06 ¹ (1,57-2,54) ² 1,38 ³ 3,09 ⁴ 1,92 ⁵	2,26 (1,48-3,04) 0,97 3,69 2,22	1,88 (1,21-2,54) 0,80 3,45 1,73	2,02 (1,31-2,73) 0,69 3,85 1,84
	%	34,3 (25,2-43,5) 18,0 50,0 32,8	33,1 (24,3-41,9) 16,0 56,0 32,0	29,3 (19,6-39,1) 14,0 58,0 30,0	25,4 (16,3-34,5) 8,0 46,0 24,0 *p < 0,05 **p < 0,05
Т-лимфоциты, CD45 ⁺ CD3 ⁺	10 ⁹ /л	1,58 (1,19-1,96) 1,07 2,63 1,60	1,71 (1,02-2,40) 0,75 2,92 1,63	1,33 (0,89-1,77) 0,39 2,21 1,35 *p < 0,05 **p < 0,05	1,45 (0,90-2,01) 0,51 2,58 1,42
	%	76,2 (69,2-83,2) 65,2 85,7 75,6	78,4 (70,5-86,2) 58,7 88,4 78,5	71,8 (59,9-83,6) 31,7 89,7 72,9 **p < 0,05	70,9 (61,7-80,1) 54,2 83,8 73,4 **p < 0,05

Исследованные показатели	Единицы измерения	Контрольная группа, n = 25	Больные с туберкулемами легкого, n = 31	Больные инфильтративным туберкулезом легкого, n = 45	Больные ФКТ легкого, n = 24
В-лимфоциты, CD45 ⁺ CD19 ⁺	10 ⁹ /л	0,24 (0,13-0,35) 0,10 0,52 0,23	0,25 (0,10-0,40) 0,06 0,64 0,24	0,24 (0,08-0,39) 0,03 0,59 0,19	0,35 (0,11-0,60) 0,11 0,96 0,28 *p < 0,05 ***p < 0,05
	%	11,4 (7,7-15,1) 4,2 19,8 10,6	12,1 (5,4-18,7) 2,5 33,2 11,5	12,4 (53-19,5) 2,9 29,1 10,9	17,1 (9,0-25,3) 3,5 34,6 15,9 *p < 0,05
NK-клетки, CD45 ⁺ CD3 ⁺ 16 ⁺ 56 ⁺	10 ⁹ /л	0,261 (0,124-0,397) 0,067 0,503 0,241	0,207 (0,087-0,328) 0,008 0,464 0,169 *p < 0,05	0,245 (0,092-0,398) 0,057 0,578 0,216	0,249 (0,080-0,419) 0,054 0,650 0,201
	%	12,4 (6,8-18,0) 3,8 25,2 12,9	9,1 (5,0-13,2) 0,7 17,6 8,4 *p < 0,05	12,9 (6,7-19,1) 4,2 27,0 10,7	12,9 (4,1-21,6) 2,3 29,6 9,1

Примечание. 1 – M, 2 – M±σ, 3 – Min, 4 – Max, 5 – Me, *p – в сравнении с контрольной группой, **p – в сравнении с группой больных с туберкулемами, ***p – в сравнении с группой больных инфильтративным туберкулезом.

личие, обнаруженное в количестве лимфоцитов при продуктивных (туберкулемы) и экссудативных (инфильтративный) формах воспалительного процесса – при инфильтративном туберкулезе лимфоцитов было на 16,8% меньше, чем при туберкулемах.

Анализ субпопуляций лимфоцитов показал разнонаправленные сдвиги при различных формах туберкулезного процесса. Общее количество Т-лимфоцитов (CD45⁺CD3⁺) незначительно возрастает при туберкулемах и в абсолютном, и в относительном выражении (на 8,2 и 2,9% соответственно в сравнении с контролем). При инфильтративном и ФКТ количество этих клеток, напротив, несколько снижается в сравнении с группой здоровых лиц (на 15,8% и 8,2% в абсолютных и на 5,8 и 7,0% в относительных значениях). При инфильтративном и ФКТ относительное количество Т-лимфоцитов было снижено в сравнении с больными туберкулемами, соответственно, на 8,4% и 9,6% (p < 0,05).

Количество В-лимфоцитов (CD45⁺CD19⁺) при туберкулемах и инфильтративном туберкулезе существенно не изменялось. При ФКТ их

количество достоверно увеличивалось в 1,5 раза в сравнении как с контролем, так и с двумя группами больных: с туберкулемами и инфильтративным туберкулезом легких.

Количество NK-клеток (CD45⁺CD3⁺CD16⁺56⁺) снижалось при туберкулемах более чем на 20%. У пациентов с инфильтративным и ФКТ этот показатель не отличался от контроля и был выше, чем при туберкулемах, соответственно, на 15,5 и 16,9%.

Обсуждение

Результаты проведенного исследования позволили установить, что несмотря на столь значительное снижение доли моноцитов, проявляющих функционально-метаболическую активность при разных формах туберкулезного воспалительного процесса, их абсолютное количество у больных инфильтративным и ФКТ легких оставалось практически таким же, как и у здоровых лиц. Нами это связывалось с компенсаторной реакцией – повышением общего числа моноцитов крови – ответом организма на массивное поражение клеток патогеном.

У больных с туберкулемами снижение числа этих клеток, по-видимому, можно объяснить вовлечением их в процесс поддержания отграниченного патологического процесса. Стоит отметить также, что при ФКТ наблюдалось наиболее выраженное снижение доли моноцитов, способных к генерации супероксид-аниона, которое составляло 10,1% в сравнении с пациентами, имеющими туберкулемы, а также инфильтративный туберкулез. Исследование экспрессии на моноцитах молекул адгезии – CD11b и CD11c, определяющих хемотаксис и играющих важную роль в воспалительной реакции, показало, что существенных различий между пациентами с такими формами туберкулезного воспалительного процесса, как туберкулема и инфильтративный туберкулез, обнаружено не было. Группа больных ФКТ отличалась от двух других групп больных с туберкулезным воспалительным процессом повышенной экспрессией обоих маркеров адгезии: CD11b – в среднем на 49,0%, CD11c – на 73,5%. По всей видимости, причиной такого повышения маркеров адгезии является выраженная воспалительная реакция, вызванная наличием *M. tuberculosis*, опосредованная рекрутингом моноцитов с участием цитокинов и активацией хемотаксиса. Наблюдаемое снижение антигенпрезентирующей функции моноцитов (по данным экспрессии HLA-DR-антигена) у больных с туберкулемами и ФКТ может быть обусловлено в первом случае ослаблением воспалительной реакции в результате отграничения патологического процесса при инкапсулировании туберкулемы, во втором случае – «истощением резерва» моноцитов в результате хронического течения воспалительного процесса.

Изучение полученных данных позволило установить факт большего угнетения поглотительной функции гранулоцитов у больных с активными формами туберкулеза, в сравнении с ограниченными (туберкулемы) вариантами патологического процесса. Отмечено снижение относительной поглотительной и метаболической функции фагоцитов, наблюдавшееся у больных инфильтративным туберкулезом и у пациентов с туберкулемами, компенсировавшееся приростом их общего количества. У лиц с ФКТ выявлялось повышенное абсолютное число гранулоцитов, вырабатывающих супероксид-анион, что расценивается нами, с одной стороны, как стремление организма компенсировать функциональную неполноценность фагоцитарного звена путем увеличения абсолютного числа клеток для борьбы с патогеном, с другой – не исключено, что это сопровождалось активной воспалительной реакцией, сопровождающей массивное распростране-

ние инфекции. Миграция гранулоцитов в очаг воспаления осуществляется под действием медиаторов. На гранулоцитах, также как и на моноцитах, мы оценивали экспрессию молекул адгезии. Абсолютное количество гранулоцитов, экспрессирующих CD11b⁺ и CD11c⁺ у всех изученных больных было выше, чем в группе здоровых людей, достигая наибольших значений у больных с ФКТ. Причиной выявленных изменений является триггерное участие CD11c в респираторном взрыве гранулоцитов.

Помимо фагоцитов, в патологический процесс при инфекции, вызванной *M. tuberculosis*, вовлекаются и лимфоциты. Нами были исследованы основные их субпопуляции. Было выяснено, что снижение количества лимфоцитов у больных с туберкулемами носило относительный характер и соответствовало росту количества гранулоцитов и моноцитов в периферической крови пациентов.

Таким образом, проведенное исследование позволило установить, что каждая форма туберкулезного воспалительного процесса, наблюдаемая нами в группах больных с туберкулемами, инфильтративным и ФКТ легких характеризовалась определенной индивидуальной «картиной» иммунологических изменений, характеризующих патологический процесс. У больных с туберкулемами отмечалось угнетение фагоцитарной активности моноцитов, вместе с тем выявлялось снижение функционально-метаболической активности данных клеток, оцениваемое по продукции супероксид-аниона и экспрессии маркера HLA-DR. На гранулоцитах увеличивалось количество молекул адгезии 11b и 11c. Отмечалось повышение числа Т-лимфоцитов, снижение числа НК-клеток. Инфильтративный туберкулез характеризовался увеличением популяции моноцитов с повышением на них экспрессии HLA-DR. На гранулоцитах увеличивалось количество молекул адгезии 11b и 11c, число Т-лимфоцитов снижалось. При ФКТ мы наблюдали лейкоцитоз, увеличение количества моноцитов и гранулоцитов. Основными функциональными особенностями моноцитов при данной форме туберкулезного воспалительного процесса стало значительное число клеток, экспрессирующих на своей поверхности молекулы адгезии 11b и 11c. Гранулоциты характеризовались увеличением функционально-метаболической активности клеток, оцениваемой по продукции ими супероксид-аниона, а также ростом популяции клеток, экспрессирующих CD11b⁺. При фиброзно-кавернозном туберкулезе увеличивалось количество В-клеток.

Список литературы / References

1. Мордык А.В., Батищева Т.Л., Брюханова Н.С., Пузырева Л.В. Влияние иммунологических нарушений на исход впервые выявленного инфильтративного туберкулеза у социально сохраненных пациентов // Инфекция и иммунитет, 2014. Т. 4, №4. С. 353-358. [Mordyk A.V., Batishcheva T.L., Bryukhanova N.S., Puzyreva L.V. Influence of immunological disorders on an outcome for the first time diagnosed infiltrative tuberculosis in socially safe patients. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 4, pp. 353-358. doi: 10.15789/2220-7619-2014-4-353-358 (In Russ.)]
2. Ameglio F., Casarini M., Capoluongo E., Mattia P., Puglisi G., Giosuè S. Post-treatment changes of six cytokines in active pulmonary tuberculosis: differences between patients with stable or increased fibrosis. *Int. J. Tuberc. Lung. Dis.*, 2005, Vol. 9, no. 1, pp. 98-104.
3. Ariga H., Harada N. Evolution of IGRA researches. *Kekkaku*, 2008, Vol. 83, no. 9, pp. 641-652.
4. Bell L.C.K., Breen R., Miller R.F., Noursadeghi M., Lipman M. Paradoxical reactions and immune reconstitution inflammatory syndrome in tuberculosis. *International J. of Infectious Diseases*, 2015, Vol. 32, pp. 39-45.
5. Dorhoi A., Kaufmann S.H. Pathology and immune reactivity: understanding multidimensionality in pulmonary tuberculosis. *Semin. Immunopathol.*, 2015, Vol. 5, pp. 1-14.
6. Duque C., Arroyo L., Ortega H., Montufar F., Ortiz B., Rojas M., Barrera L.F. Different responses of human mononuclear phagocyte populations to *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Tuberculosis*, 2014, Vol. 94, Issue 2, pp. 111-122.
7. Ferraz J.C., Melo F.B.S., Albuquerque M.F.P.M., Montenegro S.M.L., Abath F.G.C. Immune factors and immunoregulation in tuberculosis. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 2006, Vol. 39, no. 11, pp. 1387-1397.
8. Flannagan R.S., Cosío G., Grinstein S. Antimicrobial mechanisms of phagocytes and bacterial evasion strategies. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, no. 7, pp. 355-366.
9. Hunter R.L. Pathology of post primary tuberculosis of the lung: an illustrated critical review. *Tuberculosis (Edinburgh, Scotland)*, 2011, Vol. 91, no. 6, pp. 497-509.
10. Miranda M.S., Breiman A., Allain S., Deknuydt F., Altare F. The tuberculous granuloma: an unsuccessful host defence mechanism providing a safety shelter for the bacteria? *Clinical and Developmental Immunology*, 2012, Vol. 2012, pp. 1-14.
11. Ramachandra L., Smialek J. L., Shank S. S., Convery M., Boom W. H., Harding C. V. Phagosomal processing of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 85b is modulated independently of mycobacterial viability and phagosome maturation. *Infection and Immunity*, 2005, Vol. 73, no. 2, pp. 1097-1105.
12. Sakamoto K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Veterinary Pathology*, 2012, Vol. 49, no. 3, pp. 423-439.
13. Sakharova I.I., Ariél B.M., Skvortsova I.A., Knoring B.E., Vishnevski B.I., Aleshina G.M., Kokriakov V.N. Immunological parameters and mycobacterial biological properties in infiltrative pulmonary tuberculosis. *Probl. Tuberk. Bolezn. Legk.*, 2005, no. 11, pp. 14-18.
14. Sharma S.K., Mohan A., Sharma A. Challenges in the diagnosis and treatment of miliary tuberculosis. *Indian J. Med. Res.*, 2012, Vol. 135, no. 5, pp.703-730.
15. Tuberculosis / M. Monir Madkour, ed. Germany: Springer Science & Business Media, 2004. 930 p.
16. Ulrichs T., Kosmiadi G.A., Jörg S., Pradl L., Titukhina M., Mishenko V., Gushina N., Kaufmann S.H.E. Differential organization of the local immune response in patients with active cavitary tuberculosis or with nonprogressive tuberculoma. *J. Infect. Dis.*, 2005, Vol. 192, no. 1, pp. 89-97.
17. Van Crevel R., Ottenhoff T.H.M., Van der Meer J.W.M. Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2002, Vol. 15, no. 2, pp. 294-309.
18. Vergne I., Chua J., Singh S.B., Deretic V. Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome. *Annu Rev. Cell Dev. Biol.*, 2004, Vol. 20, pp. 367-394.
19. Walzl G., Ronacher K., Hanekom W., Scriba T.J., Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nature Reviews Immunology*, 2011, Vol. 11, pp. 343-354.
20. Wang Q, Liu S., Tang Y., Liu Q., Yao Y. MPT64 Protein from *Mycobacterium tuberculosis* inhibits apoptosis of macrophages through NF- κ B-miRNA21-Bcl-2 pathway. *J. Plos*, 2014, Vol. 9, Issue 7, pp. 1-8.

Авторы:

Бердюгина О.В. — д.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория диагностических и экспериментальных методов исследования, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Ершова А.В. — научный сотрудник, лаборатория диагностических и экспериментальных методов исследования, ФГБУ «Уральский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Berdyugina O.V., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Diagnostic and Experimental Research, Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation

Yershova A.V., Research Associate, Laboratory of Diagnostic and Experimental Research, Ural Research Institute of Phthisiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 31.08.2015
Принята к печати 01.12.2015

Received 31.08.2015
Accepted 01.12.2015

ДИНАМИКА ИЗМЕНЕНИЙ УРОВНЕЙ ЦИТОКИНОВ НА ГОСПИТАЛЬНОМ ЭТАПЕ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ КЛИНИЧЕСКИМИ ВАРИАНТАМИ ОСТРОГО КОРОНАРНОГО СИНДРОМА

Бернс С.А., Киприна Е.С., Шмидт Е.А., Веремеев А.В., Барбараш О.Л.

*Федеральное государственное бюджетное научное учреждение научно исследовательский институт
«Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия*

Резюме. В исследование включены 120 больных с острым коронарным синдромом (ОКС), которые были разделены: I – группа больных с ОКС с подъемом сегмента ST (n = 80); II – группа больных с ОКС без элевации сегмента ST (n = 40). Определяли уровни интерлейкина (IL)-6, -8, -10 и фактора некроза опухоли- α (TNF α) количественным методом твердофазного иммуноферментного анализа на 1-е и 10-е сутки исследования. На первые сутки заболевания в обеих группах пациентов отмечался сходный с референсными значениями уровень IL-8 и TNF α , в то время как уровень IL-10 в обеих группах был значительно снижен по сравнению с нормативными значениями. В остром периоде ОКС только в группе пациентов с элевацией ST отмечается повышение уровня IL-6, в то время как во II группе уровень IL-6 был в пределах нормативных значений. На 10-е сутки от начала заболевания уровень TNF α в обеих исследуемых группах больных достоверно увеличивался по сравнению с уровнем данного показателя на 1-е сутки. В то время как уровень IL-6 и IL-10 значимо снижался с первых по десятые сутки в обеих исследуемых группах больных. Разнонаправленная динамика отмечена относительно уровня провоспалительного цитокина IL-8: в группе пациентов с ОКС с элевацией ST концентрация данного цитокина имела выраженную тенденцию к повышению (на 40%), а во II группе пациентов – к снижению на 54% с первых по 10-е сутки наблюдения.

Динамика концентрации цитокинов в группах пациентов с различными клиническими вариантами ОКС в целом однонаправленна, однако повышение концентрации IL-8 к 10-м суткам заболевания только в группе больных с ОКС с элевацией сегмента ST может свидетельствовать о разной силе воспалительного ответа.

Ключевые слова: динамика цитокинов, острый коронарный синдром с элевацией ST и без подъема ST

Адрес для переписки:

*Бернс Светлана Александровна
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение научно исследовательский институт
«Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновы бульвар, 6.
Тел.: 8 (3842) 64-45-71.
Факс: 8 (3842) 64-34-10.
E-mail: svberns@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Berns Svetlana A.
Federal State Budgetary Institution Research Institute for
Complex Issues of Cardiovascular Diseases
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6.
Phone: 7 (3842) 64-45-71.
Fax: 7 (3842) 64-34-10.
E-mail: svberns@yandex.ru*

Образец цитирования:

*С.А. Бернс, Е.С. Киприна, Е.А. Шмидт, А.В. Веремеев,
О.Л. Барбараш, «Динамика изменений уровней цитокинов
на госпитальном этапе у больных с различными
клиническими вариантами острого коронарного синдрома»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 33-40.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-33-40*

© Бернс С.А. и соавт., 2016

For citation:

*S.A. Berns, E.S. Kiprina, E.A. Shmidt, A.V. Veremeev, O.L.
Barbarash, "Dynamics of cytokine levels in the hospitalized patients
with different clinical types of acute coronary syndrome", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 1, pp. 33-40.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-33-40*

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-33-40>

DYNAMICS OF CYTOKINE LEVELS IN THE HOSPITALIZED PATIENTS WITH DIFFERENT CLINICAL TYPES OF ACUTE CORONARY SYNDROME

Berns S.A., Kiprina E.S., Shmidt E.A., Veremeev A.V., Barbarash O.L.

Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. The study included 120 patients with acute coronary syndrome (ACS), which were divided: in two groups, respectively, with ACS-ST segment elevation (group 1, n = 80), and without this clinical sign (group 2, n = 40). The levels of interleukins (IL)-6, -8, -10, and tumor necrosis factor- α (TNF α) were determined by quantitative ELISA test on the 1st and 10th days of the study. In both groups, the IL-8 and TNF α values on day 1 were similar to the reference level, whereas IL-10 levels were significantly reduced as compared to the standard values. IL-6 level was increased in patients with ACS-ST elevation only in acute phase of ACS, while the patients from group 2 showed normal IL-6 values. On the day 10, TNF α levels in the both groups of patients were significantly increased as compared to the 1st day, whereas IL-6 and IL-10 levels were significantly decreased by the day 10 in both groups of patients. Differential dynamics of IL-8 was observed for these groups of the patients from the day 1 to day 10, i.e., the IL-8 concentration showed a tendency to increase (by 40%) for the group 1 and decrease by 54% in the group 2. In conclusion, the patient grouped by different clinical ACS variants exhibit a similar dynamics of cytokine concentrations, but an increase of IL-8 by the day 10 of the disease was seen only in patients with ACS segment elevation. It may be indicative of different intensity of the inflammatory response.

Keywords: cytokine dynamics, acute coronary syndrome, ST elevation trait

Введение

Высокая распространенность ишемической болезни сердца (ИБС) и связанная с ней летальность определяют актуальность научных исследований, направленных на углубленное изучение патогенеза ургентной формы заболевания – острого коронарного синдрома (ОКС) [7, 27]. Необычайно быстрый прогресс кардиологии в последние десятилетия привлекает внимание исследователей к решению проблемы адекватной и своевременной диагностики острых коронарных событий. По данным ряда исследований, у больных с ОКС частота развития серьезных клинических событий, таких как смерть и инфаркт миокарда (ИМ), составляет от 10 до 17% в год [15].

В настоящее время уже ни у кого не вызывает сомнений факт патогенетической взаимосвязи ОКС и повышенной экспрессии цитокинов [11]. Воспаление сосудистой стенки признается дополнительным фактором риска развития ОКС [5, 8]. Однако основная дискуссия ведется вокруг вопроса о причинно-следственном характере этой связи, так как у одних и тех же медиаторов, в зависимости от их концентрации, могут наблюдаться совершенно противоположные эффекты.

Цитокины, представляющие собой обширную гетерогенную группу низкомолекулярных белков гликопротеинов, продуцируемых преимущественно лимфоцитами, моноцитами, тканевыми макрофагами, в ответ на внешний, внеклеточный стимул участвуют фактически во всех стадиях иммунных воспалительных реакций. Цитокины, преимущественно произведенные моноцита-

ми, включают интерлейкины (IL): IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 и фактор некроза опухоли TNF α [4, 14].

Провоспалительные цитокины являются ключевыми медиаторами клеточно-опосредованного иммунного ответа, однако их системная продукция еще не означает высокую эффективность иммунитета. Во избежание избыточных проявлений системного воспаления включаются механизмы контроля, опосредованные продукцией противовоспалительных и ингибиторами провоспалительных цитокинов, подавляющих системную воспалительную реакцию. Полагают, что процессы воспаления способствуют отложению липопротеидов в сосудистой стенке и имеют существенное патогенетическое значение для дестабилизации атеросклеротической бляшки и развития атеротромботических осложнений [10].

Дисбаланс цитокинов приводит к активации иммуновоспалительных реакций и может носить как адаптивный, так и дезадаптивный характер. Так, провоспалительные цитокины, участвующие в регуляции воспалительного процесса и фагоцитарной активности нейтрофилов, усиливают процессы стабилизации и заживления. Баланс между процессами заживления и воспаления определяет степень активности атеросклеротической бляшки и клиническое проявление ИБС. Вместе с тем доказано, что повышение уровня цитокинов плазмы крови является прогностически неблагоприятным фактором в развитии и течении ОКС вследствие увеличения риска внутрисосудистого тромбообразования [1, 2, 21].

Многочисленность и в то же время неоднозначность данных литературы об участии цитокинов в развитии ОКС и его осложнений, а также в отношении сроков определения и динамики медиаторов воспаления обусловили актуальность и целесообразность проведения настоящего исследования.

Целью данной работы явилось изучение динамики изменений уровня цитокинов у больных с различными клиническими вариантами ОКС на госпитальном этапе.

Материалы и методы

В основу данной работы положены результаты обследования 120 больных с ОКС. Больные были разделены на группы следующим образом: I – группа больных с ОКС с подъемом сегмента ST ($n = 80$); II – группа больных с ОКС без элевации сегмента ST ($n = 40$). В момент госпитализации выполнялось стандартное клинико-лабораторное обследование. В первые сутки от момента поступления всем пациентам осуществлялась коронароангиография (КАГ) на аппарате INNOVA 3100 (США) с последующим проведением чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики (ЧТКА) с имплантацией металлического сетчатого эндопротеза без лекарственного покрытия (стент “Driver”).

Материалом для исследования служила периферическая кровь, забранная из кубитальной вены в количестве 10 мл. Кровь забирали в вакутейнеры на 1-е сутки до проведения КАГ и на 10-е сутки после госпитализации. Пробирки с кровью центрифугировали на рефрижераторной центрифуге «Eppendorf Centrifuge 5804R» (Eppendorf, Germany) при 3000 об/мин в течение 15 минут. Определяли уровни IL-6, IL-8, IL-10 и TNF α количественным методом твердофазного иммуноферментного анализа набором «Invitrogen Biosource» (Invitrogen Corporation, USA). Измерение концентрации исследуемых показателей проводили на иммуноферментном планшетном ридере «Униплан» (ПИКОН, Россия). С целью определения референтных значений цитокинов была исследована кровь 20 добровольцев без признаков инфекционных и сердечно-сосудистых заболеваний соответствующего возраста.

Все пациенты были госпитализированы не позднее 12 часов от развития болевого синдрома, среднее время ($M \pm s$) от начала заболевания до диагностической КАГ составило $5,01 \pm 2,45$ часа. Средний возраст ($M \pm s$) для больных I группы составил $56,7 \pm 8,7$ лет, для больных II группы – $58,8 \pm 7,0$ лет. Среди обследованных пациентов преобладали мужчины: 69 человек (86,3%) – в I группе и 29 (72,5%) – во II группе исследуемых пациентов. Исходная клиническая характеристика больных, включенных в исследование, представлена в таблице 1.

Среди исследуемых больных I группы около четверти пациентов перенесли в прошлом ИМ, половина из них подвергались ЧТКА со стентированием. Около половины пациентов отмечали ранее клинику стенокардии и являлись курильщиками. По наличию факторов риска, среднему показателю индекса массы тела (ИМТ), фракции выброса левого желудочка (ФВЛЖ) исследуемые группы пациентов статистически значимо не различались.

В течение первых десяти дней госпитального периода в группе больных с ОКС с элевацией сегмента ST развилось два (2,5%) летальных исхода вследствие рецидива ИМ. Среди больных с ОКС без элевации сегмента ST летальных исходов отмечено не было.

Статистическая обработка результатов проводилась с помощью пакета прикладных программ «Statistica 6.0». Для описания признаков с отличным от нормального распределения определяли медиану с указанием межквартильного размаха – 25-й и 75-й процентиля. Для оценки достоверности различий выборок, не подчиняющихся нормальному распределению, использовали непараметрический критерий Манна–Уитни, качественные признаки сравнивали по критерию Пирсона с поправкой Ейтса и точному критерию Фишера. Различия считали достоверными при уровне значимости 0,05 ($p < 0,05$).

Результаты

На первые сутки заболевания как в группе пациентов с ОКС с подъемом ST, так и без подъема сегмента ST отмечается сходный с референтными значениями уровень IL-8 и TNF α , в то время как уровень IL-10 в обеих группах был значительно снижен по сравнению с нормативными значениями. В остром периоде ОКС только в группе пациентов с элевацией ST отмечается повышение уровня IL-6, в то время как во II группе уровень IL-6 был в пределах нормативных значений.

Уровень TNF α в группе больных с ОКС с элевацией сегмента ST на 10-е сутки от начала заболевания достоверно ($p = 0,001$) увеличивался на 38,5% по сравнению с уровнем данного показателя на 1-е сутки (табл. 2). Аналогичная динамика прослеживалась и во II исследуемой группе больных, где концентрация TNF α достоверно ($p = 0,03$) увеличивалась на 41% (табл. 3).

Анализ концентрации провоспалительного IL-6 показал снижение его уровня с первых по десятые сутки в обеих исследуемых группах больных в среднем на 65% ($p = 0,002$).

Разнонаправленная динамика отмечена относительно уровня провоспалительного цитокина IL-8: в I группе пациентов с ОКС с элевацией ST концентрация данного цитокина имела выраженную тенденцию к повышению (на 40%), а во II группе пациентов – к снижению на 54% с первых по 10-е сутки наблюдения.

ТАБЛИЦА 1. ИСХОДНАЯ КЛИНИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ОКС С ПОДЪЕМОМ СЕГМЕНТА ST (ОКСпST) И ОКС БЕЗ ПОДЪЕМА СЕГМЕНТА ST (ОКСбпST)

Показатели	Группа больных с ОКСпST (I) n = 80	Группа больных с ОКСбпST (II) n = 40	p
Возраст, годы (M±s)	56,7±8,7	58,8±7,0	p > 0,05
Мужской пол, n (%)	69 (86,3)	29 (72,5)	p > 0,05
ИМТ, кг/м ² (M±s)	28,0±4,08	28,6±4,63	p > 0,05
Курение, n (%)	48 (60,0)	16 (40,0)	p > 0,05
Стенокардия в анамнезе, n (%)	35 (43,8)	12 (30,0)	p > 0,05
ПИКС, n (%)	23 (28,8)	8 (20,0)	p > 0,05
ОНМК в анамнезе, n (%)	8 (10,0)	2 (5,0)	p > 0,05
ФВЛЖ на момент госпитализации, %	49,9±8,89	51,9±8,58	p > 0,05
Класс СН по Killip: I, n (%) II-IV, n (%)	65 (82%) 15 (18%)	36 (91%) 4 (9%)	p > 0,05
ЧКВ в анамнезе, n (%)	10 (12,5)	1 (2,5)	p > 0,05
Наличие СД 2 типа, n (%)	5 (6,3)	3 (7,5)	p > 0,05
Наличие АГ, n (%)	75 (93,7)	28 (70,0)	p > 0,05
Длительность АГ, годы	56 (70,0)	21 (52,5)	p > 0,05
Локализация поражения на ЭКГ, n (%) – передняя – задняя	30 (37,5) 50 (62,5)	16 (40,0) 24 (60,0)	p > 0,05

Примечание. ПИКС – постинфарктный кардиосклероз, ЧКВ – чрескожное коронарное вмешательство, ИМТ – индекс массы тела, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, СД – сахарный диабет, АГ – артериальная гипертензия, ФВЛЖ – фракция выброса левого желудочка, ЭКГ – электрокардиограмма, СН – сердечная недостаточность.

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С ОКС С ПОДЪЕМОМ СЕГМЕНТА ST В 1-Е И НА 10-Е СУТКИ ОТ РАЗВИТИЯ СИМПТОМОВ

Показатель	ОКС с подъемом сегмента ST (I группа)						P	Референтные значения
	(1-е сутки от начала развития симптомов ОКС) (n = 80)			(на 10-е сутки) (n = 78)				
	25%	Медиана	75%	25%	Медиана	75%		
IL-6, пг/мл	2,47	6,3	11,6	1,05	2,42	4,35	0,002	1,7-4,28
IL-8, пг/мл	1,77	4,3	7,74	2,81	7,05	10,39	0,062	2,94-4,3
IL-10, пг/мл	2,08	3,2	12,5	1,13	1,79	2,5	0,001	14,4-16,1
TNFα, пг/мл	2,51	4,0	6,1	3,88	6,5	9,7	0,001	1,4-3,7

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С ОКС БЕЗ ПОДЪЕМА СЕГМЕНТА ST В 1-Е И НА 10-Е СУТКИ ОТ РАЗВИТИЯ СИМПТОМОВ

Показатель	ОКС без подъема сегмента ST (II группа)						P	Референтные значения
	(1-е сутки от начала развития симптомов ОКС) (n = 40)			(на 10-е сутки) (n = 40)				
	25%	Медиана	75%	25%	Медиана	75%		
IL-6, пг/мл	1,93	4,61	8,3	0,09	1,42	4,37	0,002	1,7-4,28
IL-8, пг/мл	0,86	3,89	6,39	0,57	1,79	8,26	0,88	2,94-4,3
IL-10, пг/мл	1,22	2,58	3,57	0,97	1,21	1,72	0,04	14,4-16,1
TNFα, пг/мл	4,52	5,48	7,42	5,69	9,3	12,6	0,03	1,4-3,7

При анализе концентрации противовоспалительного IL-10 в исследуемых группах пациентов к 10-м суткам отмечалась однонаправленная динамика: выявлено снижение концентрации на 45% к 10-м суткам заболевания как в I, так и II группе пациентов.

На втором этапе исследования проведен сравнительный анализ динамики уровней цитокинов в зависимости от класса СН по Killip. Учитывая малое количество пациентов с классом СН по Killip II-IV в группе пациентов с ОКС без элевации сегмента ST, сравнительный анализ маркеров воспаления проведен только в группе больных ОКС с элевацией ST.

Среди больных с ОКС с элевацией сегмента ST выявлено 15 пациентов (18,7%) с Killip II-IV; остальные 65 пациентов (81,3%) имели класс СН Killip I. Выявлено статистически значимо высокое содержание IL-8 на десятые сутки заболевания в группе пациентов с Killip II-IV по отношению к показателю группы пациентов с Killip I: 9,0 (6,9; 11,1) пг/мл против 4,1 (2,5; 9,13) пг/мл; ($p = 0,029$). В отношении остальных цитокинов как в первые, так и на десятые сутки различий в изучаемых группах пациентов получено не было. Однако отмечены особенности динамики цитокинов с первых по десятые сутки внутри групп пациентов с Killip I и Killip II-IV. Так, в подгруппе пациентов с Killip II-IV отмечалось значимое нарастание уровня TNF α к десятым суткам заболевания с 2,9 (0,5; 6,4) до 11,1 (8,1; 11,9) пг/мл ($p = 0,009$). Аналогичные результаты по уровню TNF α прослеживались и в группе пациентов с Killip I: увеличение с 5,6 (2,5; 5,8) до 9,88 (6,4; 13,7) пг/мл ($p = 0,001$) с первых по 10-е сутки в течение госпитального периода. Кроме того, у пациентов с Killip I отмечалось значимое снижение уровня IL-6 (с 0,88 (0,5; 1,2) до 0,28 (0,08; 0,78) пг/мл; $p = 0,001$), в то время как в группе с более высоким классом СН по Killip значимого снижения уровня этого цитокина не прослеживалось.

Обсуждение

Как известно, для выявления факторов, влияющих на развитие неблагоприятных исходов, целесообразно определение изменения концентрации маркеров иммунного ответа. Так, для оценки цитокинового статуса была исследована динамика концентрации IL-6, IL-8, IL-10, TNF α в крови больных с различными клиническими вариантами ОКС с первых по десятые сутки от начала развития симптомов (I и II группы).

Нами установлено достоверное увеличение концентрации провоспалительного цитокина TNF α с первых по десятые сутки заболевания как в группе больных с ОКС с элевацией сегмента ST, так и в группе больных ОКС без подъема сегмента ST. Известно, что существует два основных направления действия TNF α . Данный ци-

токин, являясь провоспалительным медиатором первой волны иммунного ответа, в ответ на тканевое повреждение запускает каскад реакций, в результате которого наступает фаза цитокиновой стимуляции [23]. Существуют данные, свидетельствующие о том, что высокая концентрация TNF α является наиболее независимым предиктором неблагоприятного прогноза коронарных событий, превосходящим по своей точности и специфичности все другие прогностические маркеры. Вторым из наиболее важных свойств TNF α является его иммуномодулирующее действие, вызываемое активацией макрофагов, нейтрофилов, эозинофилов и эндотелиальных клеток [3]. Таким образом, повышение концентрации TNF α на 10-е сутки от начала симптомов ОКС может свидетельствовать как об интенсификации воспалительного ответа, так и о начале регенеративных иммунорегулирующих процессов, направленных на восстановление баланса иммунной системы.

Далее в ходе исследования нами было выявлено достоверное уменьшение уровней IL-6 на 10-е сутки от дебюта ОКС по сравнению с первыми сутками заболевания в обеих исследуемых группах. В работах проведенных ранее было установлено как снижение, так и повышение уровня IL-6 к концу первой недели заболевания в зависимости от типа ОКС [12, 18]. Известно, что IL-6 имеет значение в развитии ОКС как провоспалительный гепатоцитактивирующий фактор, продуцируемый моноцитами, макрофагами, лимфоцитами, фибробластами и клетками эндотелия. Важно отметить, что провоспалительные эффекты IL-6 сходны с таковыми TNF α . Однако IL-6, более чем TNF α , влияет на синтез белков острой фазы воспаления. Активируясь несколько позже, чем TNF α , IL-6 подавляет его образование, в то время как TNF α , наоборот, стимулирует выделение IL-6 [6]. Кроме того, эффект IL-6 более специфичен в отношении развития воспаления, тогда как провоспалительные цитокины первой фазы в большей степени инициируют его экспрессию. Таким образом, снижение концентрации IL-6 в группах больных с различными клиническими вариантами ОКС к 10-м суткам от развития заболевания в нашем исследовании, вероятно, свидетельствует об уменьшении стимулирующего влияния TNF α на IL-6-продуцирующие клетки. Тем не менее, концентрация самого TNF α в крови на 10-е сутки госпитализации оставалась высокой.

По результатам исследования обозначается разнонаправленная динамика уровней провоспалительного цитокина IL-8 в группах больных с разными клиническими вариантами ОКС. В нашем исследовании, как и в ранее проведенных работах [9], отмечена высокая концентрация IL-8 в активной фазе ОКС с элевацией ST.

IL-8 известен как хемотаксический фактор Т-клеток и фактор, активирующий нейтрофилы. Относясь к группе хемокинов, IL-8 обеспечивает хемотаксис в зону воспаления различных типов клеток: нейтрофилов, моноцитов, эозинофилов и Т-клеток. [16]. Кроме того, IL-8 вызывает экспрессию молекул межклеточной адгезии и усиливает прилипание нейтрофилов к эндотелиальным клеткам и субэндотелиальным матричным белкам. Это свидетельствует о его основной роли в опосредовании воспалительного ответа [24]. Таким образом, значительное повышение уровня IL-8 в группе больных с ОКС с элевацией сегмента ST на 10-е сутки от начала симптомов заболевания может объясняться активностью клеток эндотелия сосудов. При анализе концентрации противовоспалительного IL-10 в обеих исследуемых группах больных с ОКС отмечалось однонаправленное снижение концентрации данного цитокина к 10-м суткам от начала симптомов заболевания. Известно, что IL-10 является противовоспалительным цитокином, в отличие от IL-8, который, будучи мощным провоспалительным маркером, участвует в запуске механизмов, приводящих к дисфункции эндотелия [13]. Можно предположить, что снижение концентрации провоспалительных цитокинов IL-6 и IL-8 на 10-е сутки госпитализации является результатом воздействия IL-10. Концентрация IL-10 на 10-е сутки достоверно снижалась вследствие уменьшения иммунновоспалительного ответа. Важно отметить, что роль IL-10 в развитии ОКС неоднозначна. По данным ряда исследований, IL-10 считается единственным цитокином, обладающим противовоспалительными свойствами, его дефицит может провоцировать непосредственное развитие ОКС, а повышенный уровень IL-10 обуславливает сниженный риск смерти или повторного ИМ [19, 20, 22]. В то же время известно, что концентрация в крови IL-10 у пациентов с ОКС достоверно выше по сравнению с группой здоровых людей. Кроме того, IL-10 повышает цитотоксическую активность макрофагов, способствует миграции в очаг воспаления нейтрофилов, усиливает выработку колониестимулирующих факторов [26], а по другим данным [25] – подавляет функцию макрофагов и секрецию ими провоспалительного цитокина IL-6. Можно предположить, что по принципу обратной связи снижение уровня IL-6 на 10-е сутки от начала симптомов ОКС повлекло за собой достоверное снижение IL-10.

Анализ цитокинового статуса среди подгруппы больных с ОКС с элевацией сегмента ST, осложненного острой сердечной недостаточностью (СН), соответствующей Killip \geq II, показал статистически значимо высокую концентрацию

провоспалительного цитокина IL-8 на десятые сутки заболевания по отношению к показателю в группе пациентов с Killip I, что может быть свидетельством более обширного повреждения в кардиомиоцитах, а значит, более длительного восстановительного периода в группе пациентов с Killip \geq II. Кроме того, вне зависимости от класса по Killip выявлено достоверное повышение уровня такого мощного провоспалительного цитокина, как TNF α к десятым суткам заболевания.

По данным предыдущих исследований, увеличение сыровоточного уровня TNF α наблюдается при хронической СН и в большинстве случаев коррелирует с функциональным классом острой СН по Killip [17].

Таким образом, сравнительный анализ динамики изменений уровня цитокинов в группах больных с различными клиническими вариантами ОКС показал некоторые принципиальные различия. Несмотря на то, что TNF α считается ранним предиктором неблагоприятных осложнений ОКС, в нашем исследовании мы наблюдали его повышение на фоне снижения концентрации других провоспалительных цитокинов. То есть можно говорить об участии этого цитокина в восстановлении эндотелиальной функции и регенеративных процессах в сосудах после развития острого коронарного события и своевременного проведения ЧКВ. Однако в отношении прогноза исхода заболевания у пациентов с ОКС с высоким классом острой СН вопрос о роли TNF α остается открытым.

Заключение

У пациентов с различными клиническими вариантами ОКС динамика концентрации цитокинов была в целом однонаправленной, о чем свидетельствует достоверное снижение уровня IL-6, IL-10 и увеличение концентрации TNF α . В группе пациентов с ОКС при элевации сегмента ST отмечено повышение концентрации IL-8 к 10-м суткам заболевания, в отличие от больных с ОКС без элевации сегмента ST, что может свидетельствовать о разной силе воспалительного ответа. Независимо от клинического варианта ОКС, отмечалось достоверное повышение концентрации TNF α к 10-м суткам от начала симптомов ОКС, что, возможно, является проявлением интенсификации воспалительного ответа в эти сроки заболевания. У пациентов с ОКС с элевацией сегмента ST наличие более высокого класса по Killip сопряжено с повышением уровня IL-8 на 10-е сутки заболевания, что подтверждает участие воспалительных процессов в развитии острой сердечной недостаточности.

Список литературы / References

1. Алекперов Э.З., Наджафов Р.Н. Современные концепции о роли воспаления при атеросклерозе // Кардиология, 2010. Т. 50, № 6. С. 88-91. [Alekperev E.Z., Nadzhafov R.N. Contemporary concepts of the role of inflammation in atherosclerosis. *Kardiologiya = Cardiology*, 2010, Vol. 50, no. 6, pp. 88-91. (In Russ.)]

2. Воскобой В.И., Ребров В.И. Влияние антиагрегантов на концентрацию цитокинов плазмы крови у больных острым коронарным синдромом // Клиническая медицина, 2003. № 6. С. 23-28. [Voskoboy V.I., Rebrov A.P. Effects of antiaggregants on concentration of plasma cytokines in patients with acute coronary syndrome. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2003, no. 6, pp. 23-28. (In Russ.)]
3. Гайковая Л.Б., Кухарчик Г.А., Нестерова Н.Н., Вавилова Т.В., Бурбелло А.Т., Шабров А.В. Современные лабораторные маркеры в определении прогноза при остром коронарном синдроме и мониторинге терапии // Вестник аритмологии, 2010. № 58. С. 52-59. [Gaikova L.B., Kucharchyk G.A., Nesterova N.N., Vavilov T.V., Burbello A.T., Shabrov A.V. Contemporary laboratory markers in determining the prognosis of acute coronary syndrome and monitoring of treatment. *Vestnik aritmologii = Bulletin of Arrhythmology*, 2010, no. 58, pp. 52-59. (In Russ.)]
4. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление, 2003. Т. 2, № 3. С. 20-33. [Demyanov A.V., Kotov A.Yu., Simbirtsev A.S. Diagnostic value of cytokine studies in clinical practice. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2003. Vol. 2, no. 3, pp. 20-33. (In Russ.)]
5. Коган-Пономарев М.Л., Левицкий И.В., Двоскина И.М., Руда М.Я. Клинический пример мультифокальной нестабильности при остром коронарном синдроме // Кардиология, 2003. Т. 43, № 4. С. 84-87. [Kogan-Ponomarev M.Ya., Levitsky I.V., Dvoskina I.M., Ruda M.Ya. Clinical example of systemic character of instability in acute coronary syndrome. *Kardiologiya = Cardiology*, 2003, Vol. 43, no. 4, pp. 84-87. (In Russ.)]
6. Колопкова Т.А., Скворцов Ю.И., Ильин А.А., Кувшинова Л.Е. Фактор некроза опухоли: морфология, патофизиология, диагностическое значение // Паллиативная медицина и реабилитация, 2007. № 2. С. 40-39. [Kolopkova T.A., Skvortsov Yu.I., Ilyin A.A., Kuvshinova L.E. Tumor necrosis factor: morphology, pathophysiology, diagnostic value. *Palliativnaya meditsina i rehabilitatsiya = Palliative Medicine and Rehabilitation*, 2007, no. 2, pp. 40-39. (In Russ.)]
7. Концевая А.В., Калинина А.М., Колтунов И.Е., Оганов Р.Г. Социально-экономический ущерб от острого коронарного синдрома в Российской Федерации // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2011. № 7 (2). С. 158-166. [Kontsevaya A.V., Kalinina A.M., Koltunov I.E., Oganov R.G. Socio-economic damage by acute coronary syndrome in Russian Federation. *Ratsionalnaya farmakoterapiya v kardiologii = Rational Pharmacotherapy in Cardiology*, 2011, no. 7 (2), pp. 158-166. (In Russ.)]
8. Кратнов А.Е., Хрусталева О.А., Ильин М.В. Дискуссионные вопросы патогенетической терапии острых коронарных синдромов // Российский кардиологический журнал, 2001. № 1. С. 57-65. [Kratnov A.E., Khrustaleva O.A., Ilyin M.V. Controversial issues of pathogenetic treatment of acute coronary syndromes. *Rossiyskiy kardiologicheskiy zhurnal = Russian Cardiology Journal*, 2001, no. 1, pp. 57-65. (In Russ.)]
9. Мазуров В.И., Шальнев В.И. Значение хемокинового звена в течение острого коронарного синдрома // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования, 2010. Т. 2, № 4. С. 25-29. [Mazurov V.I., Shalnev V.I. The role of chemokine link in acute coronary syndrome setting. *Vestnik Sankt-Petersburgskoy meditsinskoy akademii poslediplomnogo obrazovaniya = Bulletin of St. Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education*, 2010, Vol. 2, no. 4, pp. 25-29. (In Russ.)]
10. Мустафина О.Е., Тимашева Я.Р. Цитокины и атеросклероз: молекулярные механизмы патогенеза // Молекулярная медицина, 2008. № 1. С. 56-64. [Mustafina O.E., Timasheva Ya.R. Cytokines and atherosclerosis: molecular mechanisms of pathogenesis. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2008, no. 1, pp. 56-64. (In Russ.)]
11. Оганов Р.Г., Закирова Н.Э., Закирова А.Н. Иммуновоспалительные реакции при остром коронарном синдроме // Рациональная фармакотерапия в кардиологии, 2007. № 5. С. 15-19. [Oganov R.G., Zakirova N.E., Zakirova A.N., Salakhova G.M., Plotnikova M.R. Immuno-inflammatory responses in acute coronary syndrome. *Ratsionalnaya farmakoterapiya v kardiologii = Rational Pharmacotherapy in Cardiology*, 2007, no. 5, pp. 15-19. (In Russ.)]
12. Осипова О.А., Афанасьев Ю.И., Косарева И.Н. Содержание цитокинов в крови у больных сердечной недостаточностью при остром коронарном синдроме // Фундаментальные исследования, 2007. № 10. С. 67-68. [Osipova O.A., Afanasiev Yu.I., Kosareva I.N. The cytokines in the blood of patients with heart failure in acute coronary syndrome. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*, 2007, no. 10, pp. 67-68. (In Russ.)]
13. Покровская Е.В., Ваулин Н.А., Грацианский Н.А., Аверков О.В., Деев А.Д. Острый коронарный синдром без подъемов сегмента ST на ЭКГ: агрегация тромбоцитов и маркеры воспаления при раннем применении аторвастатина и правастатина // Кардиология, 2003. № 1. С. 7-18. [Pokrovskaya E.V., Vaulin N.A., Gratsiansky N.A., Averkov O.V., Deev A.D. Markers of inflammation and platelet aggregation in patients with non ST elevation acute coronary syndrome treated with atorvastatin or pravastatin. Randomized comparative study. *Kardiologiya = Cardiology*, 2003, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)]
14. Ройт А. Основы иммунологии: (пер. с англ.). М.: Мир, 1991. 327 с. [Roit A. Basis of Immunology]. Moscow: Mir, 1991. 327 p.
15. Сайгитов Р.Т., Глезер М.Г., Семенов Д.П., Малыгина М.А. Особенности прогнозирования при остром коронарном синдроме у мужчин и женщин // Кардиоваскулярная терапия и профилактика, 2006. № 1. С. 63-70. [Saygitov R.T., Glezer M.G., Sementsov D.P., Malygina N.A. Gender-specific prognosis in acute coronary syndrome. *Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika = Cardiovascular Therapy and Prevention*, 2006, no. 1, pp. 63-70. (In Russ.)]
16. Сологуб Т.В., Романцов М.Г., Кремень Н.В., Александрова Л.М., Аникина О.В., Суханов Д.С., Коваленко А.Л., Петров А.Ю., Ледванов М.Ю., Стукова Н.Ю., Чеснокова Н.П., Бизенкова М.Н., Понукалина Е.В., Невважай Т.А. Свободнорадикальные процессы и воспаление (патогенетические, клинические и терапевтические аспекты). Учебное пособие для врачей. М.: Академия Естествознания, 2008. 162 с. [Sologub T.V., Romantsov M.G., Kremen N.V., Aleksandrova L.M., Anikina O.V., Sukhanov D.S., Kovalenko A.L., Petrov A.Yu., Ledvanov M.Yu., Stukova N.Yu., Chesnokova N.P., Bizenkova M.N., Ponukalina E.V., Nevvazhay T.A. Free-radical processes and inflammation (pathogenic, clinical and therapeutic aspects). A manual for physicians]. Moscow: Academy of Natural Sciences, 2008. 162 p.
17. Чернова С.И., Плохов В.Н. Дисбаланс провоспалительных цитокинов у больных ишемической болезнью сердца // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета, 2010. № 1. С. 59-62. [Chernova S.I., Plohov V.N. Imbalance of proinflammatory cytokines in patients with ischemic heart disease. *Vestnik*

Volgogradskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta = Bulletin of Volgograd State Medical University, 2010, no. 1, pp. 59-62. (In Russ.)]

18. Шальнев В.И. Динамика содержания интерлейкина-6 в плазме крови больных с острым коронарным синдромом // Скорая медицинская помощь, 2011. № 1. С. 75-79. [Shalnev V.I. The dynamic changes of interleukin-6 concentration in blood serum in acute coronary syndrome setting. *Skoraya meditsinskaya pomoshch* = *Emergency Medical Care*, 2011, no. 1, pp. 75-79. (In Russ.)]

19. Шальнев В.И., Мазуров В.И. Регуляторные нарушения ИЛ-10 при остром коронарном синдроме // Вестник Санкт-Петербургской медицинской академии последипломного образования, 2010. Т. 2, № 4. С. 65-69. [Shalnev V.I., Mazurov V.I. IL-10 regulatory disturbances in acute coronary syndrome. *Vestnik Sankt-Peterburgskoy meditsinskoy akademii posle diplomnogo obrazovaniya* = *Bulletin of St. Petersburg Medical Academy of Postgraduate Education*, 2010, Vol. 2, no. 4, pp. 65-69. (In Russ.)]

20. Шрейдер Е.В., Шахнович Р.М., Казначеева Е.И., Босых Е.Г., Ткачев Г.А., Руда М.Я. Сравнительная динамика маркеров воспаления и NT-проBNP при различных вариантах лечения больных с острым коронарным синдромом // Кардиология, 2008. Т. 48, № 8. С. 20-27. [Shreider E.V., Shakhnovich R.M., Kaznacheeva E.I., Bositykh E.G., Tkachev G.A., Ruda M.Ya. Comparative dynamics of markers of inflammation and NT-proBNP in different variants of treatment of patients with ACS. *Kardiologiya* = *Cardiology*, 2008, Vol. 48, no. 8, pp. 20-27. (In Russ.)]

21. Ammirati E., Cannistraci C.V., Cristell N.A., Vecchio V., Palini A.G., Tornvall P., Paganoni A.M., Miendlarzewska E.A., Sangalli L.M., Monello A., Pernow J., Björnstedt Bennermo M., Marenzi G., Hu D., Uren N.G., Cianflone D., Ravasi T., Manfredi A.A., Maseri A. Identification and predictive value of interleukin-6⁺ interleukin-10⁺ and interleukin-6⁻ interleukin-10⁺ cytokine patterns in ST-elevation acute myocardial infarction. *Circulation Research*, 2012, Vol. 111, pp. 1336-1348.

22. George J., Schwartzberg S., Medvedovsky D., Jonas M., Charach G., Afek A., Shamiss A. Regulatory T cells and IL-10 levels are reduced in patients with vulnerable coronary plaques. *Atherosclerosis*, 2012, Vol. 222, no. 2, pp. 519-523.

23. Garin G., Abe J., Mohan A., Lu W., Yan C., Newby A.C., Rhaman A., Berk B.C. Flow antagonizes TNF- α signaling in endothelial cells by inhibiting caspase-dependent PKC processing. *Circ. Res.*, 2007, Vol. 101, pp. 10-12.

24. James T. Willerson, Edward T.H. Yeh, Emerson C. Perin. Cytokine profile and ST-elevation myocardial infarction. *Circ. Res.*, 2012, Vol. 111, pp. 1256-1257.

25. Mallat Z., Besnard S., Duriez M., Deleuze V., Emmanuel F., Bureau M.F., Soubrier F., Esposito B., Duez H., Fievet C., Staels B., Duverger N., Scherman D., Tedgui A. Protective role of interleukin-10 in atherosclerosis. *Circ. Res.*, 1999, Vol. 85, pp. 17-24.

26. Moore K.W., Garra A., de Waal Malefyt R., Vieira P., Mosmann T.R. Interleukin-10. *Annu. Rev. Immunology*, 1993, Vol. 11, pp. 165-190.

27. Turpie A.G.G. Burden of disease: medical and economic impact of acute coronary syndromes. *Am. J. Manag. Care*, 2006, Vol. 12, pp. 430-434.

Авторы:

Бернс С.А. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник отдела мультифокального атеросклероза, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение научно исследовательский институт «Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Киприна Е.С. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела экспериментальной и клинической кардиологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение научно исследовательский институт «Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Шмидт Е.А. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела мультифокального атеросклероза, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение научно исследовательский институт «Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Веремеев А.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела экспериментальной и клинической кардиологии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение научно исследовательский институт «Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Барбараш О.Л. — д.м.н., профессор, директор, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение научно исследовательский институт «Комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Authors:

Berns S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Department of Multifocal Atherosclerosis, Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Kiprina E.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Shmidt E.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Department of multifocal atherosclerosis, Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Veremeev A.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Barbarash O.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Federal State Budgetary Institution Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 03.12.2014

Принята к печати 04.12.2014

Received 03.12.2014

Accepted 04.12.2014

АНТИТЕЛА ПРОТИВ БЕНЗО[А]ПИРЕНА И ПОЛИМОРФИЗМ CYP1A1*2A, CYP1A2*1F, GSTT1, GSTM1 У ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Глушков А.Н.^{1,3}, Поленок Е.Г.¹, Гордеева Л.А.¹, Мун С.А.¹,
Титов В.А.², Костянко М.В.³, Вафин И.А.⁴, Рагожина С.Е.⁴

¹ ФГБУН «Институт экологии человека» СО РАН, г. Кемерово, Россия

² ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

³ ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

⁴ ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Резюме. Известно, что генетический полиморфизм ферментов биотрансформации низкомолекулярных ксенобиотиков *CYP*, *GST* является одним из эндогенных факторов канцерогенеза. Вместе с тем взаимосвязи между активностью ферментов биотрансформации, количеством канцерогенных аддуктов и образованием антиканцерогенных антител у человека, в том числе при онкологических заболеваниях, до сих пор остаются мало изученными.

Цель исследования – выявить возможные ассоциации образования антител против бензо[а]пирена с генетическими полиморфизмами *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1*, *GSTM1* у здоровых мужчин и больных раком легкого.

Были обследованы 203 мужчины с немелкоклеточной формой рака легкого и 267 условно здоровых доноров без патологии органов дыхания. Иммуноанализ антител к бензо[а]пирену был выполнен с помощью твердофазного неконкурентного иммуоферментного анализа. Типирование полиморфных локусов *CYP1A1* (rs4646903), *CYP1A2* (rs762551), *GSTP1* (rs1695, rs1138272) проводили методом Real-time ПЦР с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов, генов *GSTM1(del)*, *GSTT1(del)* методом мультиплексной ПЦР с флуоресцентной детекцией продуктов в режиме Real-time.

У больных раком легкого доля случаев с высоким уровнем IgG антител к бензо[а]пирену у носителей *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+» в сочетании с аллелем С *CYP1A2*1F* была статистически значимо больше, чем у гомозигот АА *CYP1A2*1F*. У носителей аллеля С *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+» при высоких уровнях IgG антител к бензо[а]пирену риск рака легкого возрастал до 5.5. У здоровых мужчин – носителей отдельных генотипов *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1* и *GSTM1* разницы в частоте встречаемости низких и высоких уровней IgG антител к бензо[а]пирену не выявлено.

Впервые обнаружены взаимосвязи специфической иммунной реакции на химические канцерогены окружающей среды с полиморфизмом генов ферментов биотрансформации низкомолекулярных ксенобиотиков у больных раком легкого. Показана высокая информативность иммуноанализа IgG антител к бензо[а]пирену в сочетании с молекулярно-генетическим анализом *CYP1* и *GST* для определения риска рака легкого.

Ключевые слова: антитела, бензо[а]пирен, полиморфизмы генов, канцерогенез, рак легкого

Адрес для переписки:

Поленок Елена Геннадьевна
ФГБУН «Институт экологии человека» СО РАН
650065, Россия, г. Кемерово, пр. Ленинградский, 10.
Тел./факс: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: egpolenok@mail.ru

Address for correspondence:

Polenok Elena G.
Institute of Human Ecology Siberian Branch of Russian
Academy of Sciences
650065, Russian Federation, Kemerovo, Leningradskiy av., 10.
Phone: 7 (3842) 57-50-79.
E-mail: egpolenok@mail.ru

Образец цитирования:

А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, Л.А. Гордеева, С.А. Мун,
В.А. Титов, М.В. Костянко, И.А. Вафин, С.Е. Рагожина,
«Антитела против бензо[а]пирена и полиморфизм
*CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1*, *GSTM1* у здоровых муж-
чин и больных раком легкого» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 1. С. 41-50.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-41-50

© Глушков А.Н. и соавт., 2016

For citation:

A.N. Glushkov, E.G. Polenok, L.A. Gordeeva, S.A. Mun,
V.A. Titov, M.V. Kostyanko, I.A. Vafin, S.E. Ragozhina,
“Antibodies to benzo[a]pyrene and polymorphisms of *CYP1A1*2A*,
*CYP1A2*1F*, *GSTT1*, and *GSTM1* genes in healthy men and lung
cancer patients”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 41-50.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-41-50

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-41-50>

ANTIBODIES TO BENZO[A]PYRENE AND POLYMORPHISMS OF CYP1A1*2A, CYP1A2*1F, GSTT1, AND GSTM1 GENES IN HEALTHY MEN AND LUNG CANCER PATIENTS

Glushkov A.N.^{a,c}, Polenok E.G.^a, Gordeeva L.A.^a, Mun S.A.^a, Titov V.A.^b, Kostyanko M.V.^c, Vafin I.A.^d, Ragozhina S.E.^d

^a Institute of Human Ecology Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

^b Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

^d Regional Blood Bank, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Some genetic polymorphisms of *CYP* and *GST* enzymes metabolizing low-molecular weight xenobiotics may represent endogenous risk factors for carcinogenesis. However, possible relationships between the enzyme activities, amounts of carcinogen adducts and synthesis of anticarcinogen antibodies in humans (including cancer patients) are still poorly studied. The purpose of this study was to identify possible associations between occurrence of antibodies against benzo[a]pyrene, and frequency of genetic polymorphisms of *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1*, *GSTM1* in healthy men and in lung cancer patients. Materials and methods. We have examined 203 men with non-small cell lung cancer and 267 apparently healthy donors without respiratory diseases. A non-competitive solid phase immunoassay of antibodies to benzo[a]pyrene was performed. Analysis of polymorphic loci within *CYP1A1* (rs4646903), *CYP1A2* (rs762551), *GSTP1* (rs1695, rs1138272) was performed by means of real-time PCR using TaqMan technology. Null-alleles of *GSTM1* (*del*), *GSTT1* (*del*) genes were detected by multiplex PCR with real-time fluorescent assay. Results. Among the lung cancer patients, the proportion of cases with a high level of IgG antibodies to benzo[a]pyrene in carriers of *GSTT1+* and *GSTM1+* in conjunction with the *CYP1A2*1F C* allele was significantly greater than in *AA* homozygotes *CYP1A2*1F*. The risk of lung cancer was increased to 5.5 in carriers of *CYP1A2*1F C* allele combined with *GSTT1+* and *GSTM1+* at high levels of IgG antibodies to benzo [a] pyrene. In healthy male donors, we have not found differences between the incidence of low and high levels of IgG anti-benzo[a]pyrene antibodies in the carriers of certain *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1* and *GSTM1* genotypes. Conclusions. We have first reported a relationship between *CYP1* and *GST* gene polymorphisms and specific immune response to chemical carcinogens in lung cancer patients. Immunoassays of IgG antibodies to benzo[a]pyrene combined with molecular biology studies of *CYP1* and *GST* are recommended for the cancer risk assessment.

Keywords: antibodies, benzo[a]pyrene, genes polymorphisms, carcinogenesis, lung cancer

Введение

В многочисленных экспериментах *in vivo* показано, что иммунизация животных конъюгатами химических канцерогенов с белком приводит к образованию антител (АТ), специфичных к этим канцерогенам, угнетению транспорта канцерогенов из окружающей среды в кровь, перераспределению канцерогенов по органам и тканям организма, а также к торможению возникновения и роста химически индуцированных опухолей [11, 13, 15, 16, 19, 24, 25, 29, 33, 34, 36, 39, 40]. В модельных экспериментах *in vitro* специфические АТ модулировали транспорт канцерогенов (КГ) через полупроницаемые мембраны и монослой эпителиальных клеток, а также образование их метаболитов в клетках [14, 35]. Обнаруженные защитные эффекты АТ против химических КГ послужили для авторов этих ра-

бот обоснованием новой стратегии иммунопрофилактики рака у человека.

Однако развитие этого направления исследований ограничено недостаточностью знаний о механизмах образования АТ против канцерогенов окружающей среды в естественных условиях и их влияния на возникновение злокачественных опухолей у человека.

Предполагается, что иммунная и биохимическая система адаптации организма к низкомолекулярным ксенобиотикам филогенетически и функционально взаимосвязаны. Под действием ферментов биотрансформации нативные канцерогены превращаются в реактивные метаболиты, которые образуют аддукты с макромолекулами организма и становятся таким образом гаптенами. В ответ на это образуются специфические АТ, которые способствуют элиминации канцерогенов, их метаболитов и аддуктов и тем самым осуществляют защитные функции [8].

Считается, что генетический полиморфизм ферментов биотрансформации низкомолекулярных ксенобиотиков *CYP*, *GST* является одним из эндогенных факторов канцерогенеза [1, 2, 21, 28, 30, 37, 38, 41]. Аддукты метаболитов канцерогенов с ДНК и белками, а также специфичные к ним АТ действительно обнаружены у людей, подвергающихся интенсивному канцерогенному воздействию [4, 5, 7, 9, 17, 20, 22, 23, 26, 27, 31, 32, 42, 43]. А у больных злокачественными опухолями выявлено большее количество АТ к химическим канцерогенам, чем у здоровых [3, 12, 39]. Вместе с тем взаимосвязи между активностью ферментов биотрансформации, количеством канцерогенных аддуктов и образованием антиканцерогенных АТ у человека, в том числе при онкологических заболеваниях, до сих пор остаются мало изученными.

Цель исследования – выявить возможные ассоциации образования АТ против бензо[а]пирена (БП) с генетическими полиморфизмами *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1*, *GSTM1* у здоровых мужчин и больных раком легкого.

Материалы и методы

Нами были обследованы 470 мужчин. Из них – 203 мужчины с диагнозом немелкоклеточный рак легкого (РЛ), которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз РЛ в каждом случае был подтвержден морфологически, рентгенологически и эндоскопически. Среди них было 175 курящих мужчин (86%) и 28 (14%) некурящих.

В группу сравнения были включены 267 условно здоровых мужчин с Кемеровского центра крови, не болеющие РЛ и другими заболеваниями дыхательных путей. Среди них было 122 (46%) курящих и 145 (54%) некурящих. Все обследуемые мужчины были старше 40 лет.

Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 2000 г. и «Правилами

клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ АТ к БП проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [4]. Конъюгаты БП-бычий сывороточный альбумин (БП-БСА) был синтезирован по описанной в работе [18] методике. Уровни IgG АТ к БП выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$$\text{IgG-БП} = (\text{OD}_{\text{БП-БСА}} - \text{OD}_{\text{БСА}}) / \text{OD}_{\text{БСА}},$$

где $\text{OD}_{\text{БП-БСА}}$ – связывание АТ с конъюгатом БП-БСА, $\text{OD}_{\text{БСА}}$ – связывание с БСА.

Генотипирование. Выделение ДНК из лимфоцитов периферической крови проводили с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20°C .

Типирование полиморфных локусов *CYP1A1* (rs4646903), *CYP1A2* (rs762551), *GSTP1* (rs1695, rs1138272) проводили методом Real-time ПЦР с использованием технологии конкурирующих TaqMan-зондов. Реакции амплификации проводили с помощью амплификатора CFX-96 (BioRad, США). Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров и двух зондов (табл. 1), несущих «гаситель» на 3'-конце и флуоресцентных красителей (FAM и R6G) на 5'-конце. Результаты интерпретировали исходя из анализа графиков накопления флуоресценции. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, смесь содержала 40-100 нг ДНК; 300 нМ каждого праймера; по 100-200 нМ Taqman-зондов, конъюгированных с FAM или R6G; 200 мкМ-ные dNTP, амплификационный буфер, термостабильную Taq-полимеразу – 0.5 ед. акт./реакц.

Типирование генов *GSTM1(del)*, *GSTT1(del)* проводили методом Real-time ПЦР с интеркалирующим флуоресцентным красителем SYBR Green I и анализом кривых плавления. Детальное

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ *CYP1A1* (RS4646903), *CYP1A2* (RS762551) И *GSTP1* (RS1695, RS1138272)

Полиморфизм	Праймеры	Последовательность праймеров	Последовательность зондов
<i>CYP1A1</i> (rs4646903)	прямой	5'-AGTGAGAAGGTGATTATCTTTGG-3'	5'-FAM-TGAGACCATTGCCCGCTG-BHQ-3'
	обратный	5'-AGCAGGATAGCCAGGAAGAG-3'	5'-R6G-TGAGACCGTTGCCCGCTG-BHQ-3'
<i>CYP1A2</i> (rs762551)	прямой	5'-ATTCTGTGATGCTCAAAGGGTG-3'	5'-FAM-CTGTGGGCACAGGACGCA-BHQ-3'
	обратный	5'-AAGGAGGGACTAGGCTGAGG-3'	5'-R6G-CTGTGGGCCACAGGACGCA-BHQ-3'
<i>GSTP1</i> (rs1695)	прямой	5'-GATGCTCACATAGTTGGTGTAG-3'	5'-FAM-CTGCAAATACATCTCCCTCAT-BHQ-3'
	обратный	5'-GGTGGACATGGTGAATGAC-3'	5'-R6G-CTGCAAATACATCTCCCTCAT-BHQ-3'
<i>GSTP1</i> (rs1138272)	прямой	5'-GGAGCAAGCAGAGGAGAATC-3'	5'-FAM-CCTTGCCCGCTCCTGC-BHQ-3'
	обратный	5'-CAGCAGGGTCTCAAAAGGC-3'	5'-R6G-CCTTGCCCGCTCCTGC-BHQ-3'

описание структуры олигонуклеотидных праймеров и методики генотипирования приведено в работе [6]. Отсутствие флуоресцентного сигнала указывало на гомозиготность индивидуума по делеции генов *GSTM1* и *GSTT1* – «0/0». Гетерозиготы по мутации (генотип «+/0») рассматривались в одной группе с носителями нормальных генов («+»).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием ППП STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc., USA). Характер распределения показателей определили с помощью критерия Шапиро–Уилка, для оценки непараметрических признаков использовали U-критерий Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$ и непараметрический критерий χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность вариации. Риски возникновения РЛ оценивали на основании показателя отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости. Для выявления пороговых значений уровней АТ был проведен ROC-анализ [44].

Результаты

Средний уровень IgG-БП у больных РЛ ($Me \pm SD = 5,9 \pm 4,9$) оказался выше, чем у здоровых мужчин ($4,0 \pm 3,5$) в 1,5 раза ($p = 0,00001$). С помощью ROC-анализа определили пограничное значение уровней IgG-БП, по которым здоровые мужчины и больные РЛ имели наиболее значимые различия. Выяснилось, что повышенные значения уровней IgG-БП (> 5) у здоровых мужчин имели место в 38,2% случаев, а у больных РЛ в 58,1% ($\chi^2 = 17,6$, $p = 0,0006$). При этом рассчитанное значение риска РЛ (OR) составило 2,2 с 95% доверительным интервалом (CI), равном 1,5-3,3. Соответственно, при низких уровнях IgG-БП (≤ 5) OR был равен 0,4 (0,3-0,7). Не обнаружили никакой разницы по этому показате-

лю между курящими и некурящими мужчинами в обеих сравниваемых группах.

При исследовании полиморфизмов *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1* и *GSTM1* (табл. 2) не обнаружили статистически значимой разницы в частоте встречаемости отдельных генотипов между сравниваемыми группами.

Рассчитали риски РЛ при низких и высоких уровнях IgG-БП у носителей отдельных генотипов указанных *CYP* и *GST* (табл. 3). Наиболее значимые различия между здоровыми мужчинами и больными РЛ ($p = 0,002-0,0005$) обнаружены у носителей следующих генотипов: гомозигот ТТ *CYP1A1*2A*; гетерозигот СА *CYP1A2*1F*; *GSTT1*«+»; *GSTM1*«+», а также при одновременном носительстве *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+». В этих случаях высокие значения уровней IgG-БП ассоциированы с высокими значениями рисков РЛ (2,2-3,6), и наоборот, у носителей указанных генотипов с низкими уровнями IgG-БП OR снижались до 0,3-0,5.

В группе здоровых мужчин между носителями отдельных генотипов не было значимой разницы по частоте встречаемости низких и высоких уровней IgG-БП. У больных РЛ при наличии аллеля С гена *CYP1A2*1F* (СА+СС) высокие значения уровня IgG-БП выявлялись чаще, чем у гомозигот АА (66% против 50%, $\chi^2 = 4,7$, $p = 0,03$).

Частота обнаружения низких и высоких уровней IgG-БП у здоровых мужчин – носителей различных сочетаний полиморфизмов *CYP* и *GST* была одинаковой, равно как и при сочетании генотипов *CYP1A1*2A* с *GSTT1* и *GSTM1* у больных РЛ (данные не представлены). В то же время сравнение носителей отдельных генотипов *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTT1* и *GSTM1* у больных РЛ показано следующее (табл. 4).

У гомозигот АА *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+» по отдельности и вместе

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА ВСТРЕЧАЕМОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОТИПОВ *CYP1* И *GST* У ЗДОРОВЫХ МУЖЧИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО

Полиморфизм	Генотип	Здоровые (N = 267)	Больные РЛ (N = 203)
<i>CYP1A1*2A</i> (rs4646903)	ТТ	250 (93,6%)	184 (90,6%)
	СС	1 (0,4%)	0
	ТС	16 (6,0%)	19 (9,4%)
<i>CYP1A2*1F</i> (rs762551)	СС	33 (12,3%)	15 (7,4%)
	АА	116 (43,4%)	100 (49,3%)
	СА	118 (44,2%)	88 (43,3%)
<i>GSTM1</i> (del)	«0/0»	125 (46,8%)	90 (44,3%)
	«+»	142 (53,2%)	113 (55,7%)
<i>GSTT1</i> (del)	«0/0»	54 (20,2%)	49 (24,1%)
	«+»	213 (79,8%)	154 (75,9%)

ТАБЛИЦА 3. РИСКИ (OR) РАКА ЛЕГКОГО (РЛ) ПРИ НИЗКИХ (≤ 5) И ВЫСОКИХ (> 5) УРОВНЯХ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ (IgG-БП) У НОСИТЕЛЕЙ ОТДЕЛЬНЫХ ГЕНОТИПОВ *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1(del)*, *GSTM1(del)*

Генотипы	Уровни IgG-БП	Здоровые (N = 267)	Больные РЛ (N = 203)	χ^2 , (p)	OR (95%CI)
		n/%	n/%		
<i>CYP1A1*2A</i>					
TT	≤ 5	152/60,8	76/41,3	15,4 (0,0007)	0,5 (0,3-0,7)
	> 5	98/39,2	108/58,7		
TC	≤ 5	12/75,0	9/47,4	1,7 (0,2)	
	> 5	4/25,0	10/52,6		
<i>CYP1A2*1F</i>					
CC	≤ 5	19/57,6	7/46,7	0,2 (0,7)	
	> 5	14/42,4	8/53,3		
AA	≤ 5	72/62,1	50/50,0	2,7 (0,09)	
	> 5	44/37,9	50/50,0*		
CA	≤ 5	74/62,7	28/31,8	18,0 (0,0005)	0,3 (0,1-0,5)
	> 5	44/37,3	60/68,2		
CA+CC	≤ 5	93/61,6	35/34,0	17,6 (0,0006)	0,3 (0,2-0,6)
	> 5	58/38,4	68/66,0*		
<i>GSTT1</i>					
«+»	≤ 5	129/60,6	65/42,2	11,3 (0,002)	0,5 (0,3-0,7)
	> 5	84/39,4	89/57,8		
«0/0»	≤ 5	36/66,7	20/40,8	5,9 (0,02)	0,3 (0,1-0,8)
	> 5	18/33,3	29/59,2		
<i>GSTM1</i>					
«+»	≤ 5	88/62,0	42/37,2	14,5 (0,0008)	0,4 (0,2-0,6)
	> 5	54/38,0	71/62,8		
«0/0»	≤ 5	77/61,6	43/47,8	3,5 (0,06)	
	> 5	48/38,4	47/52,2		
<i>GSTT1</i> «+»/ <i>GSTM1</i> «+»	≤ 5	72/61,5	32/37,2	10,8 (0,002)	0,4 (0,2-0,7)
	> 5	45/38,5	54/62,8		
<i>GSTT1</i> «0/0»/ <i>GSTM1</i> «0/0»	≤ 5	20/68,9	10/45,5	1,9 (0,2)	
	> 5	9/31,1	12/54,5		

Примечание.* – различия между больными РЛ-носителями генотипов *CYP1A2*1F* AA и (CA+CC), $\chi^2 = 4,7$ (p = 0,03).

(*GSTT1*«+»/*GSTM1*«+»), высокие уровни IgG-БП выявлялись значительно реже (p = 0,02-0,003), чем у носителей аллеля С (CA и CA+CC) в тех же сочетаниях с *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+».

Между здоровыми мужчинами и больными РЛ – гомозиготами AA *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+» не было значимой разницы по частоте обнаружения низких и высоких уровней IgG-БП и поэтому риски РЛ не были выявлены. У больных РЛ – носителей аллеля С *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+» низкие уровни IgG-БП обнаруживали реже, чем у здоровых с такими же сочетаниями генотипов. При этом OR снижались до 0,2-0,3. Риски РЛ возрастали до 3,0-5,5 у носителей

аллеля С в сочетании с *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+», если при этом уровни IgG-БП были высокими.

Частота обнаружения высоких уровней IgG-БП у больных РЛ – носителей аллеля С *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTM1*«+» была выше, чем у больных РЛ – носителей того же аллеля в сочетании с *GSTM1*«0/0» (75,8% против 51,2%, $\chi^2 = 5,6$, p = 0,02). При этом OR достигал 4,7 в сравнении со здоровыми людьми. А у носителей аллеля С *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTM1*«+» и низкими уровнями IgG-БП OR снижался до 0,2. Частота обнаружения высоких и низких уровней IgG-БП у здоровых и больных РЛ – носителей аллеля С в сочетании с *GSTM1*«0/0» была одинаковой и OR не изменялся.

ТАБЛИЦА 4. ЧАСТОТА ОБНАРУЖЕНИЯ (%) НИЗКИХ (≤ 5) И ВЫСОКИХ (> 5) УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ К БЕНЗО[А]ПИРЕНУ (IgG-БП) У БОЛЬНЫХ РАКОМ ЛЕГКОГО – НОСИТЕЛЕЙ ОТДЕЛЬНЫХ СОЧЕТАНИЙ ГЕНОТИПОВ *CYP1A2*1F*, *GSTT1(del)* И *GSTM1(del)*

	Генотипы <i>CYP1A2*1F</i>	Генотипы <i>GST</i>	Уровни IgG-БП у больных РЛ		χ^2 , (p)	Уровни IgG-БП	
			≤ 5	> 5		≤ 5	> 5
			n/%	n/%		OR	OR
1	AA	<i>GSTT1</i> «+»	40/51,3	38/48,7	5,6 (0,02)	–	–
	CA	<i>GSTT1</i> «+»	20/30,3	46/69,7		0,3	3,6
2	AA	<i>GSTT1</i> «+»	40/51,3	38/48,7	4,6 (0,03)	–	–
	CA+CC	<i>GSTT1</i> «+»	25/32,9	51/67,1		0,3	3,0
3	AA	<i>GSTM1</i> «+»	27/52,9	24/47,1	7,3 (0,008)	–	–
	CA	<i>GSTM1</i> «+»	14/25,5	41/74,5		0,2	4,2
4	AA	<i>GSTM1</i> «+»	27/52,9	24/47,1	8,7 (0,004)	–	–
	CA+CC	<i>GSTM1</i> «+»	15/24,2	47/75,8		0,2	4,7
5	AA	<i>GSTT1</i> «+»/ <i>GSTM1</i> «+»	23/54,8	19/45,2	7,2 (0,008)	–	–
	CA	<i>GSTT1</i> «+»/ <i>GSTM1</i> «+»	9/23,1	30/76,9		0,2	7
6	AA	<i>GSTT1</i> «+»/ <i>GSTM1</i> «+»	23/54,8	19/45,2	9,4 (0,003)	–	–
	CA+CC	<i>GSTT1</i> «+»/ <i>GSTM1</i> «+»	9/20,5	35/79,5		0,2	4,5
7	CA+CC	<i>GSTM1</i> «+»	15/24,2	47/75,8	5,6 (0,02)	0,2	4,7
	CA+CC	<i>GSTM1</i> «0»	20/48,8	21/51,2		–	–

Примечание. Значения OR для указанных сочетаний генотипов *CYP1A2*1F* и *GST* при низких и высоких уровнях IgG-БП рассчитаны в сравнении со здоровыми мужчинами; прочерк означает отсутствие разницы между здоровыми и больными – носителями указанных сочетаний генотипов по частоте обнаружения низких и высоких уровней IgG-БП.

Обсуждение

Большинством исследователей обнаружено повышение содержания АТ, специфичных к аддуктам БП-диолэпоксид-ДНК в сыворотке крови людей, подвергающихся воздействию полициклических ароматических углеводородов в быту, на производстве или при лечении псориаза каменноугольной смолой [10, 17, 20, 31, 32]. При этом не удавалось выявить АТ, специфичных к аддуктам БП-диолэпоксид-белок [20, 32], хотя образование таких аддуктов с гемоглобином и альбумином у человека доказано [22, 23, 30, 31, 32]. Высокие уровни АТ к аддуктам БП-диолэпоксид-ДНК обнаружены у членов семей, в которых были больные РЛ и хронической обструктивной болезнью легких [27]. Концентрация АТ, специфичных

к нативному БП, была повышена у рабочих в условиях воздействия БП [4, 5, 7], а также у больных раком молочной железы и РЛ [3, 12, 39].

В настоящем исследовании высокие уровни IgG-БП обнаружены в 38,2% случаев у здоровых мужчин и в 58,1% у больных РЛ. Рассчитанное значение OR составило 2,2. Этот показатель не много выше, чем ранее выявленный (1,3) при анализе АТ к аддуктам БП-диолэпоксид-ДНК [27]. Особый интерес представляет отсутствие различий в образовании IgG-БП между курящими и некурящими здоровыми и больными РЛ. Это свидетельствует об определяющем значении эндогенных факторов в регуляции специфического иммунного ответа на химические канцерогены окружающей среды.

Результаты многочисленных исследований полиморфизма генов биотрансформации ксенобиотиков остаются противоречивыми, одним авторам удается обнаружить ассоциации с риском РЛ, другие отрицают такие связи [1, 2, 21, 28, 37, 41, 42]. В нашей работе также не выявлены различия между здоровыми донорами и больными РЛ по частоте встречаемости отдельных аллелей и генотипов *CYP1A1*2A* (rs4646903), *CYP1A2*1F* (rs762551), *GSTT1(del)* и *GSTM1(del)*.

До сих пор оставался открытым вопрос о взаимосвязи образования АТ против химических канцерогенов окружающей среды и активностью ферментов их биотрансформации. С одной стороны, обнаружена высокозначимая корреляция между активностью микросомальной арил-гидрокарбонгидроксилазы и уровнем аддуктов БП-диолэпоксид-ДНК в легочной паренхиме у больных РЛ [9], а *GSTM1*«+» был ассоциирован с низкими уровнями таких аддуктов у курящих европеоидов [26, 42]. При этом в отдельных работах ассоциации *GSTM1* с ДНК и белковыми аддуктами БП-диолэпоксида не выявлены [30, 32]. С другой стороны, отмечено одновременное повышение количества ДНК аддуктов в лимфоцитах и специфичных к ним АТ в сыворотке крови людей при интенсивном воздействии БП [20, 32]. Поэтому образование АТ против химических канцерогенов в зависимости от активности ферментов их биотрансформации весьма вероятно, коль скоро канцерогены в составе аддуктов представляют собой гаптены и потенциально способны индуцировать синтез специфических АТ.

Нам не удалось выявить различия в частоте встречаемости низких и высоких уровней IgG-БП в группе здоровых мужчин – носителей отдельных генотипов *CYP1A1*2A*, *CYP1A2*1F*, *GSTT1* и *GSTM1*. В то же время у больных РЛ доля случаев с высоким уровнем IgG-БП у носителей *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+» в сочетании с аллелем С *CYP1A2*1F* была статистически значимо больше, чем у гомозигот АА *CYP1A2*1F*. Кроме того, у больных РЛ с аллелем С частота обнаружения высоких уровней IgG-БП оказалась значительно выше при одновременном наличии *GSTM1*«+», по сравнению с *GSTM1*«0». Отсутствие подобных взаимосвязей у здоровых мужчин может оказаться кажущимся и проявиться при анализе других полиморфных вариантов этих же генов, других генов биотрансформации ксенобиотиков и других сочетаний генов.

У носителей аллеля С *CYP1A2*1F* в сочетании с *GSTT1*«+» и *GSTM1*«+» при повышенных уровнях IgG-БП риск РЛ возрастает до 5.5, т.е. в 2 раза больше, чем при анализе только IgG-БП без учета генотипов *CYP1* и *GST*.

Таким образом, впервые обнаружены взаимосвязи специфической иммунной реакции на химические канцерогены окружающей среды с полиморфизмом генов ферментов биотрансформации низкомолекулярных ксенобиотиков у больных РЛ. Показана высокая информативность иммуноанализа IgG-БП в сочетании с молекулярно-генетическим анализом *CYP1* и *GST* для определения риска РЛ.

Список литературы / References

1. Аткарская В.И., Заварыкина Т.М., Жижина Г.П., Бурлакова Е.Б. Полиморфизм генов биотрансформации ксенобиотиков и контроль клеточной пролиферации в ассоциации с риском развития рака дыхательных путей в Московском регионе // Молекулярная медицина, 2012. № 6. С. 52-56. [Atkarskaya M.V., Zavarykina T.M., Zhizhina G.P., Burlakova E.B. Polymorphisms of xenobiotics biotransformation and cell proliferation control genes and their association with risk of cancer of respiratory tract in population of Moscow region. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2012, no. 6, pp. 52-56. (In Russ.)]
2. Белогубова Е.В., Того А.В., Суворова И.К., Карпова М.Б., Улыбина Ю.М., Зайцева О.А., Яцук О.С., Шуткин В.А., Рябоконт С.А., Соколенко А.П., Иевлева А.Г., Чекмарева Е.В., Лемехов В.Г., Колосков А.В., Кучинский А.П., Хансон К.П., Имянитов Е.Н. Распределение аллелей гена *CYP1A1* у больных раком легкого, доноров среднего возраста и пожилых людей без онкологической патологии // Вопросы онкологии, 2004. Т. 50, № 2. С. 165-168. [Belogubova Ye.V., Togo A.V., Suvorova I.K., Karpova M.B., Ulybina Yu.M., Zaitseva O.A., Jatsook O.S., Shootkin V.A., Ryabokon S.A., Sokolenko A.P., Iyevleva A.G., Chekmareva E.V., Lemekhov V.G., Koloskov A.V., Kuchinsky A.P., Hanson K.P., Imyanitov E.N. *CYP1A1* allele distribution in lung cancer patients, middle-aged donor and elderly tumor-free subjects. *Voprosy onkologii = Questions of Oncology*, 2004, Vol. 50, no. 2, pp. 165-168. (In Russ.)]
3. Глушков А.Н., Аносова Т.П., Небесная Н.Г., Железнова Л.Я. Изотипические особенности антител к полициклическим ароматическим углеводородам у больных раком молочной железы, желудка, толстой и прямой кишки // Экспериментальная онкология, 1996. Т. 18. С. 426-428. [Glushkov A.N., Anosova T.P., Nebesnaya N.G., Zheleznova L.Ya. Isotypic special features of antibodies to polycyclic aromatic hydrocarbons in patients with cancer of mammary gland, stomach, colon and rectum. *Ekspierimental'naya onkologiya = Experimental Oncology*, Vol. 18, pp. 426-428. (In Russ.)]

4. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянко М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные aberrации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5 (14), № 1. С. 39-44. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ya.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kost'anko M.V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 5 (14), no. 1, pp. 39-44. (In Russ.)]
5. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Мун С.А., Ларин С.А., Зинчук С.Ф. Антитела к бензо[а]пирену как маркер канцерогенной нагрузки у рабочих углеперерабатывающей промышленности // Гигиена и санитария, 2010. № 2. С.53-56. [Glushkov A.N., Polenok Ye.G., Mun S.A., Larin S.A., Zinchuk S.F. Benz(a)pyrene antibodies are a marker of carcinogenic load in coal-processing workers. *Gigiena i sanitariya = Hygiene and Sanitation*, 2010, no. 2, pp. 53-56. (In Russ.)]
6. Глушкова О.А., Гордеева Л.А., Шаталина И.В., Ермоленко Н.А., Попова О.С., Гареева Ю.В., Воронина Е.Н., Симонова Т.А., Сутулина И.М., Филипенко М.Л., Глушков А.Н. Ассоциации материнских полиморфизмов генов *CYP1A2*1F* и *GST* с врожденными пороками развития у плода и новорожденного // Молекулярная медицина, 2012. № 2. С. 39-46. [Glushkova O.A., Gordeeva L.A., Shatalina I.V., Ermolenko N.A., Popova O.S., Gareeva Yu.V., Voronina E.N., Simonova T.A., Sutulina I.M., Filipenko M.L., Glushkov A.N. Association of maternal polymorphisms of genes *CYP1A2*1F* and *GST* and their combination of congenital malformations in fetus and newborn. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2012, no. 2, pp. 39-46. (In Russ.)]
7. Дианова Д.Г., Харахорина Р.А., Ланин Д.В. Показатели иммунного статуса женщин, работающих в условиях воздействия бензо[а]пирена // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6 (14), № 2 (1). С. 47-48. [Dianova D.G., Kharakhorina R.A., Lanin D.V. Parameters of the immune status in female subjects exposed to benzo(a)pyrene at workplace. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2012, Vol. 6 (14), no. 2 (1), pp. 47-48. (In Russ.)]
8. Ковалев И.В., Шипулина Н.К. Иммунохимические механизмы адаптации организма к окружающей среде // Известия РАН, серия биологическая, 1992. Т. 1. С. 31-41. [Kovalev I.V., Shipulina N.K. Immunochemical mechanisms of adaptation to the environment. *Izvestiya RAN, seriya biologicheskaya = Proceedings of Russian Academy of Sciences, Biological Series*, 1992, Vol. 1, pp. 31-41. (In Russ.)]
9. Alexandrov K., Rojas M., Geneste O., Castegnaro M., Camus A., Petruzzelli S., Giuntini C., Bartsch H. An improved fluorometric assay for dosimetry of benzo(a)pyrene diol-epoxide – DNA adducts in smokers' lung: comparisons with total bulky adducts and aryl hydrocarbon hydroxylase activity. *Cancer Res.*, 1992, Vol. 52, no. 22, pp. 6248-6253.
10. Borska L., Andrys C., Krejsek J., Palicka V., Chmelarova M., Hamakova K., Kremlacek J., Borsky P., Fiala Z. Serum level of antibody against benzo[a]pyrene – 7,8-diol-9,10-epoxide-DNA adducts in people dermally exposed to PAHs. *J. Immunol. Res.*, 2014, Vol. 2014, Article ID 834389, 6 pages.
11. Černohorská H., Klimesova S., Lepsa L., Jinoch P., Milcova A., Schmuczerova J., Topinca J., Labaj J. Influence of immunization with non-genotoxic PAH-KLH conjugates on the resistance of organisms exposed to benzo[a]pyrene. *Mut. Res.*, 2012, Vol. 742, pp. 2-10.
12. Chagnaud J.L., Faiderbe S., Geffard M. Identification and immunochemical characterization of IgA in sera of patients with mammary tumors. *Int. J. Cancer*, 1992, Vol. 50, pp. 395-401.
13. Creech H.J., Oginsky E., Tryon M. Immunological studies of hydrocarbon-protein conjugates. *Cancer Res.*, 1947, Vol. 7, pp. 301-304.
14. De Buck S.S., Augustijns P., Muller C.P. Specific antibody modulates absorptive transport and metabolic activation of benzo[a]pyrene across Caco-2 monolayers. *J. Pharmacol. Experim. Therap.*, 2005, Vol. 313, no. 2, pp. 640-646.
15. De Buck S.S., Muller C.P. Immunopropylactic approaches against chemical carcinogenesis. *Vaccine*, 2005, Vol. 23, no. 17-18, pp. 2403-2406.
16. Galati R., Crebelli R., Zijno A., Conti L., Falasca G., Verdina A. The effect of humoral immunity against adducted benzo[a]pyrene on DNA damage elicited by acute carcinogen exposure in Swiss mice. *In Vivo*, 2000, Vol. 14, no. 6, pp. 747-751.
17. Galati R., Zijno A., Crebelli R., Falasca G., Tomei F., Iecher F., Carta R., Verdina A. Detection of antibodies to the benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts in sera from individuals exposed to low doses of polycyclic aromatic hydrocarbons. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, 2001, Vol. 20, no. 3, pp. 359-364.
18. Glushkov A.N., Kostjanko M.V., Chernov S.V., Vasilchenko I.L. Synthesis of polycyclic aromatic hydrocarbon-protein conjugates for preparation and immunoassay of antibodies. *Rus. J. Immunol.*, 2002, Vol. 7, pp. 42-46.
19. Grova N., Prodhomme E.J., Schellenberger M.T., Farinelle S., Muller C.P. Modulation of carcinogen bioavailability by immunization with benzo[a]pyrene – conjugate vaccines. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, pp. 4142-4151.

20. Harris C.C., Vahakangas K., Newman M.J. Detection of benzo[a]pyrene diol epoxide – DNA adducts in peripheral blood lymphocytes and antibodies to these adducts in serum from cokeoven workers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1985, Vol. 82, pp. 6672-6676.
21. Hung R.J., Boffetta P., Brockmüller J., Butkiewicz D., Cascorbi I., Clapper M.L., Garte S., Haugen A., Hirvonen A., Anttila S., Kalina I., Le Marchand L., London S.J., Rannug A., Romkes M., Salagovic J., Schoket B., Gaspari L., Taioli E. CYP1A1 and GSTM1 genetic polymorphisms and lung cancer risk in Caucasian non-smokers: a pooled analysis. *Carcinogenesis*, 2003, Vol. 24, no. 5, pp. 875-882.
22. Käfferlein H.U., Marczyński B., Mensing T., Brüning T. Albumin and hemoglobin adducts of benzo[a]pyrene in humans-analytical methods, exposure assessment, and recommendations for future directions. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2010, Vol. 40, no. 2, pp. 126-150.
23. Lee B.M., Yin B.Y., Herbert R., Hemminki K., Perera F.P., Santella R.M. Immunologic measurement of polycyclic aromatic hydrocarbon-albumin adducts in foundry workers and roofers. *Scand. J. Work Environ. Health*, 1991, Vol. 17, no. 3, pp. 190-194.
24. Moolten F., Capparel N., Boger E. Reduction of respiratory tract binding of benzo(a)pyrene in mice by immunization. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1978, Vol. 61, no. 5, pp. 1347-1349.
25. Moolten F.L., Schreiber B., Rizzone A. Protection of mice against 7.12 – dimethylbenz(a)anthracene – induced skin tumors by immunization with fluorinated analog of carcinogen. *Cancer Res.*, 1981, Vol. 41, pp. 452-459.
26. Mooney L.A., Madsen A.M., Tang D., Orjuela M.A., Tsai W.-Y., Garduno E.R., Perera F.P. Antioxidant vitamin supplementation reduces benzo(a)pyrene – DNA adducts and potential cancer risk in female smokers. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2005, Vol. 14, no. 1, pp. 273-242.
27. Pauk N., Klimesova S., Kara J., Topinka J., Labaj J. The relevance of monitoring of antibodies against the Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) adducts in serum in relation to lung cancer and obstructive pulmonary disease (COPD). *Neoplasma*, 2013, Vol. 60, no. 2, pp. 182-187.
28. Pavannello S., Fedeli U., Mastangelo G., Rota F., Overvad K., Raaschou-Nielsen O., Tjønneland A., Vogel U. Role of CYP1A2 polymorphisms on lung cancer risk in a prospective study. *Cancer Genet.*, 2012, Vol. 205, no. 6, pp. 278-284.
29. Peck R.M., Peck E.B. Inhibition of chemically induced neoplasia by immunization with an antigenic carcinogen- protein conjugate. *Cancer Res.*, 1971, Vol. 31, pp. 1550-1554.
30. Perera F.P., Tang D., Brandt-Rauf P., Santella R.M., Mooney L.V., Tu Y.H., Bendkowska I., Bell D.A. Lack of associations among cancer and albumin adducts, ras p21 oncoprotein levels, and protein CYP1A1, CYP2D6, NAT1, and NAT2 in a nested case-control study of lung cancer within the physicians' health study. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, 2006, Vol. 15, no. 7, pp. 1417-1419.
31. Petruzzelli S., Celi A., Pulera N., Baliva F., Viegi G., Carrozzi L., Ciacchini G., Bottai M., Di Pede F., Paoletti P., Giuntini C. Serum antibodies to benzo(a) pyrene diol epoxide DNA adducts in the general population: effects of air pollution, tobacco smoking and family history of lung diseases. *Cancer Res.*, 1998, Vol. 58, no. 8, pp. 4122-4126.
32. Santella R.M., Perera F.P., Young T.L., Zhang Y.J., Chiamprasert S., Tang D., Wang L.W., Beachman A., Lin J.H., DeLeo V.A. Polycyclic aromatic hydrocarbon – DNA and protein adducts in coal tar treated patients and controls and their relationship to glutathione S-transferase genotype. *Mutat. Res.*, 1995, Vol. 334, no. 2, pp. 117-124.
33. Schellenberger M., Grova N., Willieme S., Farinelle S., Prodhomme E., Muller C. Modulation of benzo[a]pyrene induced immunotoxicity in mice actively immunized with B[a]P-diphtheria toxoid conjugate. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009, Vol. 240, no. 1, pp. 37-43.
34. Silbart L.K., Keren D.F. Reduction of intestinal carcinogen absorption by carcinogen-specific immunity. *Science*, 1989, Vol. 243, no. 4897, pp. 1462-1464.
35. Silbart L.K., McAller F., Rasmussen M.V., Goslinoski L., Keren D.F., Finley A., Van Kruiningen H.J., Winchell J.M. Selective induction of mucosal immune responses to 2-acetylaminofluorene. *Anticancer Res.*, 1996, Vol. 16, no. 2, pp. 651-660.
36. Silbart L.K., Rasmussen M.V., Oliver A.R. Immunoprophylactic intervention in chemical toxicity and carcinogenicity. *Vet. Hum. Toxicol.*, 1997, Vol. 39, no. 1, pp. 37-43.
37. Sobti R.C., Kaur P., Kaur S., Janmeja A.K., Jindal S.K., Kishan J., Raimondi S. Combined effect of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms on histological subtypes of lung cancer. *Biomarkers*, 2008, Vol. 13, no. 3, pp. 282-295.
38. Sugimura H., Weston A., Caporaso N.E., Shields P.G., Bowman E.D., Metcalf R.A., Harris C.C. Biochemical and molecular epidemiology of cancer. *Biomed. Environ. Sci.*, 1991, Vol. 4, no. 1-2, pp. 73-92.
39. Ustinov V.A., Matveeva V.A., Kostyanko M.V., Glushkov A.N. Antibodies against benzo[a]pyrene in immunized mouse and lung cancer patients. *Experim. Oncol.*, 2013, Vol. 35, no. 3, pp. 207-210.
40. Verdina A. Carcinogen-modified DNA and specific humoral immunity toward carcinogen-DNA adducts. *Ann. Ist. Super Sanita*, 2006, Vol. 42, no. 2, pp. 189-194.
41. Vineis P., Veglia F., Anttila S., Benhamon S., Clapper M.L., Dolzan V., Ryberg D., Hirvonen A., Kremers P., Le Marchand L., Pastorelli R., Rannug A., Romkes M., Schoket B., Strange R.C., Garte S., Taioli E. CYP1A1, GSTM1

and *GSTP1* polymorphisms and lung cancer: a pooled analysis of gene-gene interactions. *Biomarkers*, 2004, Vol. 9, no. 3, pp. 298-305.

42. Weiserbs K., Jacobson J., Begg M., Wang L., Wang Q., Agrawal M., Norkus E., Young Q., Santella R. A cross-sectional study of polycyclic aromatic hydrocarbon – DNA adducts and polymorphism of glutathione-S-transferases among heavy smokers by race/ethnicity. *Biomarkers*, 2003, Vol. 8, no. 2, pp. 142-155.

43. Weston A., Rowe M.L., Manchester D.K., Farmer P.B., Mann D.L., Harris C.C. Fluorescence and mass spectral evidence for the formation of benzo[a]pyrene anti-diol-epoxide-DNA and – hemoglobin adducts in humans. *Carcinogenesis*, 1989, Vol. 10, no. 2, pp. 251-257.

44. Zweig M.H., Campbell G. ROC plots: a fundamental evaluation in clinical medicine. *Clinical Chemistry*, 1993, Vol. 39, no. 4, pp. 561-577.

Авторы:

Глушков А.Н. — д.м.н., профессор, директор ФГБУН «Институт экологии человека» СО РАН; профессор кафедры генетики биологического факультета ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Поленок Е.Г. — к.фарм.н., заведующая лабораторией иммунохимии ФГБУН «Институт экологии человека» СО РАН, г. Кемерово, Россия

Гордеева Л.А. — к.б.н., заведующая лабораторией иммуногенетики ФГБУН «Институт экологии человека» СО РАН, г. Кемерово, Россия

Мун С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммуногенетики ФГБУН «Институт экологии человека» СО РАН, г. Кемерово, Россия

Титов В.А. — заведующий торакальным отделением ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Костянко М.В. — ведущий инженер кафедры органической химии ФГБОУ ВПО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия

Вафин И.А. — главный врач ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Рагожина С.Е. — заместитель главного врача по медицинской части ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Authors:

Glushkov A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Genetics, Faculty of Biology, Kemerovo State University; Department of Molecular Human Ecology, Institute of Human Ecology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Polenok E.G., PhD (Pharmacy), Chief, Laboratory of Immunochemistry, Department of Molecular Human Ecology, Institute of Human Ecology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Gordeeva L.A., PhD (Biology), Chief Laboratory of Immunogenetics, Department of Molecular Human Ecology, Institute of Human Ecology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Mun S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunogenetics, Department of Molecular Human Ecology, Institute of Human Ecology, Siberian Branch of Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation

Titov V.A., Chief, Thoracic Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Kostyanko M.V., Leading Engineer, Department of Organic Chemistry, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation

Vafin I.A., Physician-In-Chief, Regional Blood Bank, Kemerovo, Russian Federation

Ragozhina S.E., Deputy Chief Physician for Medicine, Regional Blood Bank, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 22.06.2015

Отправлена на доработку 07.09.2015

Принята к печати 21.09.2015

Received 22.06.2015

Revision received 07.09.2015

Accepted 21.09.2015

ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА СИНТЕТИЧЕСКИХ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ АКТУАЛЬНЫЕ АНТИГЕННЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ ВИЧ

**Коробова С.В.¹, Корнилаева Г.В.², Топорова В.А.³, Николаева И.А.¹,
Трубченинова Л.П.¹, Трефильева Н.Ф.¹, Сизякина Л.П.⁴,
Сидорович И.Г.¹, Апарин П.Г.¹, Хаитов Р.М.¹**

¹ ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

² ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

⁴ Научно-исследовательский институт иммунологии Ростовского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Резюме. Разработка эффективной вакцины против ВИЧ/СПИД, способной остановить распространение вируса, по-прежнему остается важнейшей задачей в профилактике и терапии ВИЧ/СПИД. Существует множество подходов по созданию кандидатных вакцинных препаратов, основанных на индукции как нейтрализующих антител, так и активации цитотоксических лимфоцитов. Одним из перспективных направлений является использование синтетических пептидов в качестве антигенов. Пептиды способны вызывать активацию как клеточного, так и гуморального звена иммунного ответа. Оболочечный белок gp120 ВИЧ1 содержит эпитопы для нейтрализующих антител. Область V3-петли ВИЧ1 необходима для связывания вируса с корцепторами клетки, кроме того, этот эпитоп индуцирует высокий иммунный ответ. В клинических испытаниях кандидатной вакцины против ВИЧ/СПИД RV144 уровень вакцин-индуцированных антител к V1-/V2-региону обратно коррелировал с риском заражения ВИЧ. Отличительной особенностью ВИЧ является его высокая изменчивость. Использование консенсусных последовательностей позволяет вызывать иммунный ответ широкой специфичности. Нами проведено исследование иммуногенных и биологических свойств синтетических пептидов, копирующих V1-, V2-, V3-петли оболочечного белка gp120 консенсусной последовательности вирусов группы M CON-S и последовательности V3-петлю российского изолята RUA022a2. Исследуемые пептиды специфически распознавались сыворотками ВИЧ-инфицированных людей в иммуноферментном анализе, что свидетельствует об их схожести с вирусным прототипом. Пептиды сами по себе являются слабыми иммуногенами, т.к. имеют низкую молекулярную массу. Поэтому для усиления иммунного ответа они вводились совместно с полным адьювантом Фрейн-

Адрес для переписки:

Коробова Светлана Вячеславовна
ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 24, корп. 2.
Тел.: 8 (906) 706-47-67.
Факс: 8 (499) 618-71-56.
E-mail: korobovas@gmail.com

Address for correspondence:

Korobova Svetlana V.
NRC Institute of Immunology FMBA of Russia
115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye ch., 24,
bldg 2.
Phone: 7 (906) 706-47-67.
Fax: 7 (499) 618-71-56.
E-mail: korobovas@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Коробова, Г.В. Корнилаева, В.А. Топорова, И.А. Николаева, Л.П. Трубченинова, Н.Ф. Трефильева, Л.П. Сизякина, И.Г. Сидорович, П.Г. Апарин, Р.М. Хаитов, «Иммунологическая характеристика синтетических пептидов, копирующих актуальные антигенные детерминанты ВИЧ» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 51-62.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-51-62

© Коробова С.В. и соавт., 2016

For citation:

S.V. Korobova, G.V. Kornilaeva, V.A. Toporova, I.A. Nikolaeva, L.P. Trubcheninova, N.F. Treflyeva, L.P. Sizyakina, I.G. Sidorovich, P.G. Aparin, R.M. Khaïtov, "Immunological characteristic of synthetic peptides similar to actual HIV antigen determinants", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 1, pp. 51-62.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-51-62

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-51-62>

да. Иммунизация лабораторных животных вызывала образование антител на все пептиды, входящие в состав смеси, в основном IgG изотипа. Титр антител на каждый пептид зависел от его протяженности. Полученные в результате иммунизации антитела не обладали нейтрализующей активностью. Нейтрализующие свойства антител были изучены на модели псевдовиральной инфекции, используя молекулярные клоны вирусных изолятов CAP 45.2.00.G3 и QH.209.14.M.EnvA2. Нейтрализация вируса — достаточно сложный процесс, на который влияет ряд факторов: количество антител (титр), изотип антител, строение самих антител. Возможно, для индукции нейтрализующих антител данной смесью пептидных антигенов необходимо провести подбор иммуноадъювантов и способов иммунизации. Исследование биологической активности пептидов выявило, что они способны усиливать проникновение псевдовиральных частиц в клетку в модели *in vitro*. Исследование проводилось на молекулярных клонах вирусных изолятов CAP 45.2.00.G3, QH209.14M.ENV.A2, QD435.100M.ENV.E1. Данные вирусные изоляты относятся к разным субтипам ВИЧ1.

Ключевые слова: ВИЧ, пептиды, вакцина, нейтрализующие антитела, усиление инфекции, мыши

IMMUNOLOGICAL CHARACTERISTIC OF SYNTHETIC PEPTIDES SIMILAR TO ACTUAL HIV ANTIGEN DETERMINANTS

Korobova S.V.^a, Kornilaeva G.V.^b, Toporova V.A.^c, Nikolaeva I.A.^a, Trubcheninova L.P.^a, Trefilyeva N.F.^a, Sizyakina L.P.^d, Sidorovich I.G.^a, Aparin P.G.^a, Khaitov R.M.^a

^a Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

^b N.Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

^c M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d Research Institute of Immunology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Abstract. The development of HIV vaccine remains an important goal in prophylaxis and therapy of HIV/AIDS epidemics. There are various approaches for development of a candidate vaccine based on induction of neutralizing antibodies and cell-mediated immunity. Synthetic peptides are considered promising vaccine antigens since they are capable of activating both humoral and cellular immune response. HIV-1 envelope gp120 is the target for neutralizing antiviral antibodies. The V3 region of the HIV-1 gp120 is highly immunogenic and important for the virus-coreceptor interaction. In a RV144 vaccine trial, the levels of vaccine-induced IgG antibodies recognizing V1V2 regions from multiple HIV-1 subtypes show inverse correlations with a risk for HIV-1 infection. Meanwhile, HIV is characterized by high diversity. The consensus and mosaic immunogens are complete but artificial proteins, which are computationally designed to elicit immune responses with improved cross-reactive broadness. We have been studied immunogenic properties of synthetic peptides derived from V1, V2, V3 loop regions of the consensus M HIV1 (CON-S) sequence group of the gp 120 envelope protein and V3 loop derived from a Russian RUA022a2 isolate. These peptides specifically reacted to HIV-positive sera in ELISA, thus indicating their similarity to appropriate HIV proteins. The peptides proved to be weakly immunogenic. Therefore, Freund complete adjuvant was used to enhance peptide immunogenicity. To assess the immunogenicity, the mice were immunized with a peptide mixture. Antibodies have been developed to every peptide from the mixture, being, predominantly, of IgG isotype. The antibody titers depended on the length of peptide sequences. However, the sera from immunized mice did not have a HIV neutralizing activity. The serum neutralization was assessed by pseudovirus-based assay, using a molecular clone of virus isolates CAP 45.2.00.G3 and QH.209.14.M.EnvA2. The virus neutralization is a complex process and may be influenced by several factors, such as antibody titer, isotype, or antibody structure. Probably, to induce neutralizing antibodies by this peptide mixture, it is necessary to choose appropriate adjuvants and immunization schedule. Moreover, it was shown that peptides could increase *in vitro* virus infectivity in pseudovirus-based model, using the CAP 45.2.00.G3, QH209.14M.ENV.A2, QD435.100M.ENV.E1 molecular clone. These viral isolates belong to different HIV-1 subtypes.

Keywords: HIV, peptides, vaccine, neutralizing antibodies, mice, infection enhancement

Введение

Создание профилактической вакцины, способной вызывать защитный иммунный ответ против ВИЧ, является основной задачей с момента открытия ВИЧ. Иммунизация вакцинами на основе аттенуированных или инактивированных патогенов вызывает, как правило, иммунный ответ схожий с образующимся в ходе естественной инфекции. Это классический способ получения вакцинных препаратов. В случае ВИЧ-инфекции ни тот, ни другой метод не может быть использован из соображений безопасности. Поэтому при разработке вакцин против ВИЧ/СПИД используются различные варианты представления вакцинных антигенов: синтетические пептиды, рекомбинатные белки, рекомбинантные вирусные и бактериальные векторы и т.п.

Разработанные и испытанные к настоящему времени кандидатные вакцинные препараты против ВИЧ/СПИД не индуцировали защитный иммунный ответ у добровольцев, также были отмечены случаи увеличения числа инфицированных среди вакцинированных людей по сравнению с контрольными группами (получавших плацебо и неиммунизированных) (STEP trial) [2]. Исключением является клиническое испытание RV144, где была впервые показана возможность формирования протективного иммунного ответа кандидатными вакцинными препаратами. Эффективность вакцинации составила 31,9%. Вакцина, проходившая клиническое исследование в RV144, представляет собой комбинированный препарат, включающий в себя рекомбинантный вирус *Saragurox*, кодирующий гены белков ВИЧ1 gag, pol, gp120, а также рекомбинантный белок gp120.

От выбора антигена и его последовательности зависит, будет ли вакцина индуцировать защитный иммунный ответ широкой специфичности [6].

Считается, что превентивная вакцина должна вызывать образование нейтрализующих антител. Эти антитела, связываясь с вирусом, прерывают его жизненный цикл на самом раннем этапе, не допуская интеграции вирусного генома с геномом клетки-мишени. Именно интеграция является тем crucialным событием, после которого организм человека остается инфицированным на всю жизнь. Вирусный геном, сохраняясь в CD4⁺ клетках памяти и макрофагах, становится недоступным ни для специфической терапии, ни для иммунной системы [1]. Извест-

но, что нейтрализующие эпитопы расположены на оболочечном белке вируса gp120 и трансмембранном gp41 [21].

Одним из таких эпитопов является т.н. V3-петля оболочечного белка gp120. Получен ряд моноклональных антител к этому участку, обладающих широкой нейтрализующей активностью (2G12, PGT121) [9, 16]. Другим примером защитных свойств антител к V3-петле является эксперимент, в котором животным (макаки) предварительно вводили моноклональное антитело против V3-петли HGN194, после чего заражали ВИЧ. Данные животные не развивали инфекцию. HGN194 было изолировано из В-клеток памяти ВИЧ-инфицированного нонпрогрессора [17].

В настоящее время большое внимание уделяется так называемым не-нейтрализующим антителам. Эти антитела принимают участие в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (ADCC). Исследование корреляции между иммунным ответом и сниженным риском инфицирования у людей, участвующих в RV144, показало, что образовавшиеся в результате иммунизации антитела способны к ADCC. Анализ специфичности антител показал, что они направлены на V1/V2-регион gp120 [7, 18, 20].

Особенностью ВИЧ является высокая изменчивость. Базируясь на филогенетическом анализе, выделяют 9 субтипов (A-D, F-H, J, K), подсубтипы (A1-A4 и F1 и F2), а также множество циркулирующих (более 60) и уникальных рекомбинантных штаммов. Все они объединены в группу M [12]. Вирусы, входящие в эту группу, распространены по всему миру. На основании аминокислотных и нуклеотидных последовательностей белков вирусов, входящих в эту группу, была получена консенсусная последовательность CON-S [10]. Использование консенсусных последовательностей при конструировании вакцинных антигенов позволяет вызывать иммунный ответ широкой специфичности, против большинства циркулирующих штаммов.

Основной задачей нашей работы было исследование иммуногенных и биологических свойств синтетических пептидов, копирующих актуальные антигенные детерминанты ВИЧ: V1-, V2-, V3-петлю оболочечного белка gp120 ВИЧ на основе консенсусной последовательности CON-S, а также V3-петлю на основе российского изолята RUA022a2.

Материалы и методы

Синтетические пептиды

Пептиды, повторяющие V1-, V2-, V3-петлю оболочечного белка gp 120 консенсусной последовательности вирусов группы M DBX1 и последовательности V3-петли российского изолята RUA022a2 были синтезированы НПФ «Верта».

Постановка ИФА с сыворотками ВИЧ-инфицированных людей

Синтетические пептиды сорбировали в концентрации 10 мкг/мл на полистироловых планшетах («Greiner») в 0,05М карбонатно-бикарбонатном буфере 18 часов при комнатной температуре. По окончании инкубации вносили сыворотки людей в разведении 1:10 в растворе для разведения (0,01 М фосфатно-солевом буфере (0,45М NaCl) pH 7,2, содержащем 0,05% раствора Твин-20 (ФСБ-Т) и 0,02% бычьего сывороточного альбумина) (ФСБ-АТ). Выдерживали 60 мин при 37 °С. По окончании инкубации отмывали ФСБ-Т для удаления несвязавшихся антител. Далее вносили конъюгат пероксидазы хрена с антителами против γ -цепи иммуноглобулина человека (Sigma) в рабочем разведении в растворе для разведения и выдерживали 60 мин при 37 °С. По окончании инкубации лунки отмывали, вносили субстратный буферный раствор (ортофенилендиамин (ОФД) в цитратно-фосфатном перборатном буферном растворе). Реакцию останавливали, внося в лунки 0,2М H₂SO₄. Оптическую плотность (ОП) определяли при длине волны 492 нм. ОП крит. рассчитывали по формуле: ОП крит. = ОП отр. сыв. + 0,2, где ОП отр. сыв. – оптическая плотность сыворотки, не содержащей антитела к ВИЧ, в разведении 1:10

Иммунизация животных

Для работы были использованы мыши, самки линии (СВАхС57В1/6) F1 весом 16-18 г из питомника «Столбовая» РАМН. Животные содержались на стандартном рационе в условиях вивария РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. В опытах использовали мышей, прошедших карантинный режим вивария. Вся работа с лабораторными животными проводилась в соответствии с «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации». Приказ Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23.08.2010 № 708н г. Москва «Об утверждении правил лабораторной практики».

Животных иммунизировали подкожно смесью пептидов 3 раза с интервалом 3 недели в ФСБ растворе или ПАФ. Иммунизирующая доза составляла по 100 мкг/животное каждого пептида, входящего в состав смеси. Кровь отбирали из ретроорбитального синуса на 7 день (после 3-го введения).

Постановка ИФА с сыворотками иммунизированных мышей

Реакцию ставили так же как и с сыворотками людей. Отличием было разведение сывороток иммунных животных – готовили ряд двоичных разведений. Для проявления реакции были использованы конъюгаты антител кролика к IgG мыши, меченные пероксидазой хрена (Sigma) и антител кролика к IgM мыши, меченные пероксидазой хрена (Sigma).

Постановка иммуноблота с сыворотками иммунизированных мышей

Были использованы полоски нитроцеллюлозы из коммерческого набора New Lav Blot1 (Bio-Rad), где в качестве антигена используются белки культурального вируса ВИЧ. Пулированные сыворотки иммунных животных в разведении 1:100 инкубировали в ФСБ-АТ буфере совместно с полосками в течение 2 часов при покачивании при температуре 18-25 °С. По окончании инкубации полоски промывали от несвязавшихся антител. Далее в лунки добавляли раствор конъюгата: конъюгат козьих антител против иммуноглобулинов мыши с пероксидазой хрена (Sigma). Конъюгат вносили в рабочем разведении на ФСБ-АТ и выдерживали течение 1 часа при покачивании при температуре 18-25 °С. Лунки промывали раствором ФСБ-Т. Реакцию проявляли, внося в каждую лунку раствор хромогена – ТМБ. Реакцию останавливали, промывая полоски 5 раз дистиллированной водой.

Реакция нейтрализации

Реакцию ставили в полной питательной среде (DMEM, 10% FCS), содержащей 15 мкг/мл DEAE-dextran. Исследуемые сыворотки инактивировали прогреванием до 56 °С в течение 1 часа. Готовили ряд разведений сывороток (1:10 – 1:160) в полной питательной среде с DEAE-dextran, далее добавляли сток псевдовиральных частиц вирусных изолятов CAP 45.2.00.G3 и QH.209.14.M.EnvA2, в разведении соответствующему 10 TCID50 или 50TCID50. Плазмиды, необходимые для получения псевдовиральных частиц, были любезно предоставлены The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC). Инкубировали

1 час в 5% атмосфере CO₂ при 37 °С, по окончании инкубации вносили клетки линии TZM-bl (10⁴ клеток/лунку). Оставляли на 48 часов. Далее удаляли супернатант и отмывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором. Затем добавляли лизирующий раствор (0,5% NP40 в ФСБ), оставляли на 15 мин при 37 °С. Полученный лизат переносили в другой планшет и вносили раствор 2х CPRG (Roch) инкубировали 3 часа в темноте при комнатной температуре. Учитывали результаты при 540 нм.

Определение усиления инфекции

Реакцию ставили в полной питательной среде (DMEM, 10% FCS), содержащей 15 мкг/мл DEAE-dextran. Пептиды предварительно растворяли в DMSO (Sigma) и смешивали с псевдовирусными частицами вирусных изолятов CAP 45.2.00.G3, QH209.14M.ENVA2, QD435.100M.ENVE1. Концентрация пептидов составляла 10 мкг/мл, инфекционная доза – 10TCID₅₀, 50TCID₅₀, 100TCID₅₀ инкубировали 1 час при 37 °С в 5% атмосфере CO₂. В группах сравнения вирусные стоки инкубировались без пептидов в полной питательной среде или в присутствии DMSO в той же концентрации, как и при добавлении пептидов. По окончании инкубации вносили клетки линии TZM-bl (10⁴ клеток/лунку). Оставляли на 48 часов. Далее удаляли супернатант и отмывали лунки фосфатно-солевым буферным раствором (ФСБ). Затем добавляли лизирующий раствор (0,5% NP40 в ФСБ), оставляли на 15 мин при 37 °С. Полученный лизат переносили в другой планшет и вносили раствор 2х CPRG (Roch) инкубировали 1 часа в темноте при комнатной температуре. Учитывали результаты при 540 нм % усиления инфекции подсчитывали по формуле: (ОП исследуемой группы [содержащей пептиды или DMSO]/ОП контрольной [среда, без добавления пептидов и DMSO]) x 100%.

Результаты

Иммунореактивность синтетических пептидов, копирующих актуальные детерминанты ВИЧ1, с сыворотками ВИЧ-инфицированных людей

Для анализа сходства синтетических пептидов, копирующих актуальные антигенные детерминанты ВИЧ с вирусным прототипом, нами была изучена их способность связываться с антителами ВИЧ-инфицированных людей. Исследование проводили методом ИФА. Для рабо-

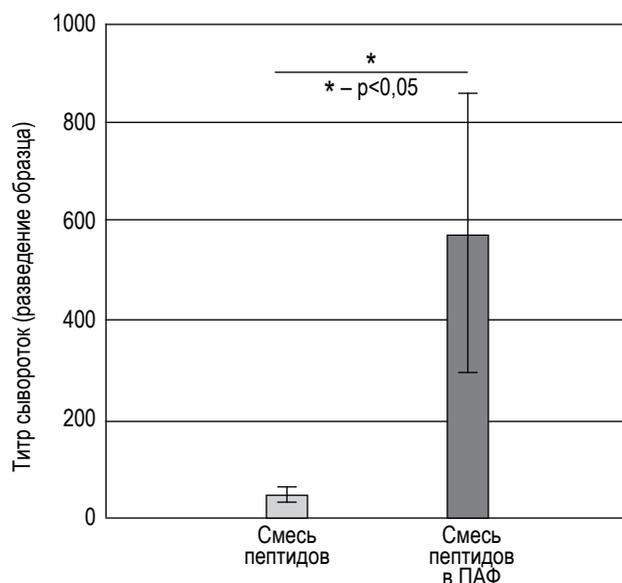


Рисунок 1. Титр антител, сывороток животных, иммунизированных смесью пептидов, копирующих V1-, V2-, V3-петлю оболочечного белка gp120 консенсусной последовательности группы M CON-S и V3-петлю российского изолята RUA022a2

ты была использована панель сывороток ВИЧ-инфицированных людей, собранных с 1986 по 2010 год в различных регионах (СССР, Россия, Иран, Узбекистан). Контролем служили сыворотки людей, не содержащих антитела к ВИЧ. Результаты представлены в таблице 1.

Большинство сывороток (31 из 34) ВИЧ-инфицированных людей распознавали синтетические пептиды, повторяющие V3-петлю консенсусной последовательности и российского изолята. V1-петлю распознавался 2 из 34 сывороток, V2-петлю – 4 из 34.

Иммуногенные свойства синтетических пептидов. Специфическая активность антител

Иммуногенные свойства синтетических пептидов были изучены на лабораторных животных – мышах. Животных иммунизировали смесью пептидов с полным адъювантом Фрейнда (ПАФ) и без него. Смесь пептидов вводили три раза. Иммуный ответ определяли после последней иммунизации (табл. 2, рис. 1).

Иммунизация лабораторных животных смесью пептидов без иммуноадъюванта вызывала слабый иммунный ответ. Использование иммуноадъюванта (ПАФ) позволило значительно увеличить титр антител. Антитела образовывались на все пептиды, входящие в состав композиции. Наибольший титр антител был отмечен для пептидов, повторяющих V2- и V3-петлю. Введение

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОРЕАКТИВНОСТЬ СЫВОРОТОК ЛЮДЕЙ, ИНФИЦИРОВАННЫХ ВИЧ, С СИНТЕТИЧЕСКИМИ ПЕПТИДАМИ, КОПИРУЮЩИМИ V1-, V2-, V3-ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГРУППЫ M CON-S И V3-ПЕТЛЮ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2

№ образца	Место сбора	Год	V1-петля консенсусной последовательности CON-S		V2-петля консенсусной последовательности CON-S		V3-петля консенсусной последовательности CON-S		V3-петля российского изолята RUA022a2	
			ОП иссл. / ОП нег.	Результат	ОП иссл. / ОП нег.	Результат	ОП иссл. / ОП нег.	Результат	ОП иссл. / ОП нег.	Результат
1	Москва	1986	1,0	отр	1,28	отр	> 8	пол	4,4	пол
2	Москва	1987	1,04	отр	2,6	пол	> 8	пол	4,5	пол
3	Москва	1995	2,99	пол	1,5	отр	н/о	н/о	> 8	пол
4	Москва	1995	1,11	отр	0,9	отр	н/о	н/о	> 8	пол
5	Москва	1994	0,8	отр	0,69	отр	> 8	пол	3,9	пол
6	Москва	1994	1,04	отр	0,79	отр	> 8	пол	3,09	пол
7	Иран	1998	0,9	отр	0,86	отр	> 8	пол	> 8	пол
8	Иран	1998	0,6	отр	0,76	отр	0,68	отр	0,2	отр
9	Москва	1995	0,6	отр	0,52	отр	> 8	пол	4,24	пол
10	Москва	1995	1,2	отр	1,04	отр	> 8	пол	4,5	пол
11	Москва	1995	1,17	отр	0,74	отр	> 8	пол	2,1	пол
12	Москва	1995	0,89	отр	0,75	отр	> 8	пол	> 8	пол
13	Москва	1995	1,25	отр	0,75	отр	> 8	пол	3,99	пол
14	Москва	1995	1,26	отр	1,32	отр	6,2	пол	1,99	пол
15	Москва	1995	1,15	отр	1,06	отр	6,0	пол	3,77	пол
16	Москва	1995	3,09	пол	2,67	пол	3,7	пол	2,86	пол
17	Москва	1995	1,0	отр	0,89	отр	> 8	пол	3,46	пол
18	Москва	1996	0,69	отр	0,97	отр	7,48	пол	3,38	пол
19	Узбекистан	2004	0,5	отр	0,98	отр	с8	пол	4,08	пол
20	Узбекистан	2004	1,3	отр	9,5	пол	> 8	пол	> 8	пол
21	Узбекистан	2004	1,06	отр	1,7	отр	> 8	пол	> 8	пол
22	Узбекистан	2004	0,84	отр	0,88	отр	> 8	пол	> 8	пол
23	Узбекистан	2004	0,7	отр	0,86	отр	> 8	пол	> 8	пол

Таблица 1 (окончание)

№ образца	Место сбора	Год	V1-петля консенсусной последовательности CON-S		V2-петля консенсусной последовательности CON-S		V3-петля консенсусной последовательности CON-S		V3-петля российского изолята RUA022a2	
			ОП иссл. / ОП нег.	Резуль- тат	ОП иссл. / ОП нег.	Резуль- тат	ОП иссл./ ОП нег.	Резуль- тат	ОП иссл. / ОП нег.	Резуль- тат
24	Узбекистан	2004	0,72	отр	1,29	отр	> 8	пол	> 8	пол
25	Узбекистан	2004	0,56	отр	0,59	отр	> 8	пол	> 8	пол
26	Узбекистан	2004	0,7	отр	1,17	отр	> 8	пол	> 8	пол
27	Узбекистан	2004	0,8	отр	2,0	пол	> 8	пол	> 8	пол
28	Иран	1998	1,23	отр	1,7	отр	> 8	пол	> 8	пол
29	Иран	1998	0,56	отр	0,5	отр	> 8	пол	1,75	пол
30	Иран	1998	1,0	отр	0,74	отр	> 8	пол	> 8	пол
31	Иран	1998	0,96	отр	0,77	отр	> 8	пол	4,44	пол
32	Иран	1998	0,62	отр	0,96	отр	> 8	пол	4,58	пол
33	Ростов-на-Дону	2010	0,67	отр	1,25	отр	> 8	пол	> 8	пол
34	Ростов-на-Дону	2010	0,56	отр	0,54	отр	> 8	пол	> 8	пол

ТАБЛИЦА 2. ТИТР АНТИТЕЛ, ПУЛИРОВАННЫХ СЫВОРОТОК ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ V1-, V2-, V3-ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГРУППЫ M CON-S И V3-ПЕТЛЮ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2

Антиген на твердой фазе	Конъюгат	V1-петля консенсусной последовательности CON-S	V2-петля консенсусной последовательности CON-S	V3-петля консенсусной последовательности CON-S	V3-петля российского изолята RUA022a2	Смесь пептидов
Пептиды	IgG	н/о	1:10	1:20	1:80	1:40
	IgM	н/о	н/о	1:20	1:20	1:20
Пептиды в ПАФ	IgG	1:40	1:10240	1:2560	1:10240	1:10240
	IgM	н/о	1:40	1:10	1:20	1:20

препарата вызывало образование антител преимущественно класса IgG.

Изучение специфической активности антител проводили методом иммуноблоттинга. Принцип этого метода заключается в том, что белки вируса ВИЧ1, полученные из лизата зараженных вирусом клеток разделяются по молекулярно-

му весу методом электрофореза в полиакриламидном геле в диссоциирующей и восстанавливающей среде, и в последующем переносятся на нитроцеллюлозную мембрану методом электропереноса. Присутствие специфических антител к белковым компонентам ВИЧ1 определяется по появлению на стрипах специфических окра-

ТАБЛИЦА 3. НЕЙТРАЛИЗУЮЩИЕ СВОЙСТВА СЫВОРОТОК ЖИВОТНЫХ, ИММУНИЗИРОВАННЫХ СМЕСЬЮ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ V1-, V2-, V3-ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГРУППЫ M CON-S И V3-ПЕТЛЮ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2

Вирусный изолят	CAP 45.2.00.G3			QH.209.14.M.EnvA2					
	50 TCID50			10TCID50			50TCID50		
Инфекционная доза	Пептиды	Пептиды В ПАФ	Негативная сыворотка	Пептиды	Пептиды В ПАФ	Негативная сыворотка	Пептиды	Пептиды В ПАФ	Негативная сыворотка
IC50	0,065	0,052	0,048	0,05	> 0,1	0,97	0,048	0,058	0,065
IC75	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,076	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,076	0,08
IC90	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,089	> 0,1	> 0,1	> 0,1	0,089	0,09
Titer 50	15	19	21	17	н/о	10	21	17	15
Titer 75	н/о	н/о	н/о	13	н/о	н/о	н/о	13	12
Titer 90	н/о	н/о	н/о	11	н/о	н/о	н/о	11	11

шенных полос (фиолетово-голубые). Их расположение на стрипе соответствует молекулярной массе вирусных белков. Антитела, полученные в результате иммунизации не распознавали белок gp160/120.

Нейтрализующая активность сывороток животных, иммунизированных синтетическими пептидами

Нейтрализующую активность антител, полученных в результате иммунизации, изучали на модели псевдовиральной инфекции [11]. Для работы нами были использованы сыворотки животных, иммунизированных смесью пептидов с ПАФ и без адьюванта. Желательно, чтобы полу-

ченные в результате иммунизации антитела могли нейтрализовать различные изоляты ВИЧ, относящиеся к различным субтипам. Известно, что на территории РФ преимущественно циркулирует ВИЧ1, принадлежащий к субтипу A1 (IDU-A) [5]. В наших исследованиях мы использовали молекулярные клоны, копирующие оболочечные белки вирусов двух субтипов А и С: CAP 45.2.00. G3 (субтип С), QH209.14M.ENV.A2 (субтип А). Контролем служили сыворотки неиммунных животных (табл. 3).

Полученные в результате иммунизации антитела не обладали нейтрализующей активностью.

ТАБЛИЦА 4. УСИЛЕНИЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ В ПРИСУТСТВИИ ПЕПТИДОВ, КОПИРУЮЩИХ V1-, V2-, V3-ПЕТЛЮ ОБОЛОЧЕЧНОГО БЕЛКА gp120 КОНСЕНСУСНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ГРУППЫ M CON-S И V3-ПЕТЛЮ РОССИЙСКОГО ИЗОЛЯТА RUA022a2

Молекулярный клон вирусного изолята	Инфекционная доза		
	10 TCID50	50 TCID50	100 TCID50
QD435.100M.ENV.E1	105	138	130,4
QH.209.14.M.EnvA2	131,6	125	115
CAP 45.2.00.G3	111	127	104,2

Примечание. Данные представлены в виде %.

Концентрации ингибирования (IC₅₀, IC₇₅, IC₉₀) и разведения, необходимые для подавления вирусной инфекции (Titer 50, 75, 90), сывороток иммунных животных не отличались от контрольной неиммунной группы.

Способность сывороток нейтрализовать различные штаммы ВИЧ зависит от многих факторов, в том числе и от титра антител. Вероятно, иммунизация лабораторных животных не вызвала образование количества или качества антитела, достаточного для нейтрализации вируса.

Биологические свойства пептидов

Основная функция участка V3-петли оболочечного белка gp120 ВИЧ состоит во взаимодействии с рецепторами клетки-мишени: CD4, CCR5 и/или CXCR4 [4]. Это специфическое рецепторное взаимодействие в конечном итоге приводит к слиянию вирусной и клеточной мембран и проникновению вирусного генетического материала в клетку. Блокирование хемокиновых рецепторов CCR5 и CXCR4 антагонистами, такими как Maraviroc, значительно уменьшает вероятность проникновения вируса в клетки-мишени [8]. Наряду с этим в ряде работ показано усиление инфекции в модели *in vitro*, после предварительной инкубации клеточных культур с пептидами, копирующими V3-петлю [3, 19].

Поэтому нами было проведено исследование возможности исследуемых пептидов усиливать инфекцию. Изучение проводили на модели псевдовirusной инфекции. Псевдовirusные частицы не способны к репликации, у них отсутствует генетический материал. Частицы связываются с соответствующими рецепторами на поверхности клеток-мишеней и проникают внутрь клетки. Из-за отсутствия генетического материала у псевдовirusных частиц внутри клетки они не реплицируются, т.е. это инфекция с одним циклом. В качестве клеток-мишеней нами была использована генетически модифицированная клеточная линия HeLa, экспрессирующая на своей поверхности рецепторы и корепторы для ВИЧ – CD4, CCR5, (TZM-bl) [13].

Смесь пептидов вносили в клеточную культуру и инкубировали в течение 1 часа, после чего добавляли псевдовirusные частицы изолятов CAP 45.2.00.G3, QH209.14M.ENV.A2, QD435.100M.ENV.E1, инфекционная доза составляла 10TCID₅₀, 50TCID₅₀ и 100 TCID₅₀. Через 2 суток определяли инфекцию. Т.к. пептиды растворены в DMSO, то контролем служили

клетки, к которым был добавлен DMSO, в той же концентрации, что и при добавлении пептидов. Группой сравнения служили клетки без пептидов и DMSO. Результаты представлены в таблице 4.

Присутствие пептидов повышало заражающую активность вируса, т.е. проникновение псевдовirusных частиц внутрь клетки, от 4 до 38% во всех группах, вне зависимости от субтипа, к которому относился вирусный клон. В контрольных группах с DMSO уровень инфекции был таким же, как и в контрольной группе (не содержащей пептиды).

Обсуждение

Разработка вакцинных препаратов на основе синтетических пептидов является одним из перспективных направлений в области создания вакцин против ВИЧ/СПИД. Основным достоинством такого типа вакцин является безопасность, способность вызывать иммунный ответ на строго определенный эпитоп, активировать как гуморальную, так и клеточную ветвь иммунного ответа. Недостатком – слабая иммуногенность и необходимость использования иммуноадъювантов.

Ранее Н. Liao и др. [10] была исследована способность пептидов, повторяющих V1-, V2-, V3-, V4- и V5-петлю оболочечного белка gp120 ВИЧ, синтезированных на основе консенсусной последовательности группы М ВИЧ1 (CON-S), абсорбировать нейтрализующие антитела против ряда изолятов ВИЧ. Исследование проводили на модели псевдовirusной инфекции. Оказалось, что только пептиды, копирующие V3-петлю, были способны уменьшать нейтрализующую активность сывороток (86% по отношению к изоляту B.SS1196, 92% – C.TV, 67% – C.DU123, 33% – C.DU172, 43% – C.02ZM233M, 48% – A.92RW020). Используемые изоляты относились к разным субтипам. Иммунизация морских свинок этими пептидами не приводила к образованию нейтрализующих антител. Однако иммунизация животных рекомбинантным белком gp140ΔCFI последовательности CON-S, повторяющим часть оболочечного белка ВИЧ, индуцировала нейтрализующие антитела. Т.е. представление антигенов в определенной конформации является существенным моментом для развития протективного иммунного ответа.

В этой работе нами были изучены иммуногенные свойства пептидов, повторяющие акту-

альные антигенные детерминанты ВИЧ (V1-, V2- и V3-петлю оболочечного белка gp120 ВИЧ1), основанные на консенсусной последовательности группы M CON-S и российского изолята RUA022a2 (V3-петля).

Исследование специфической активности исследуемых пептидов показало, что большинство сывороток ВИЧ-инфицированных людей распознавало антигены, копирующие V3-петлю. V1- и V2-пептиды распознавались лишь небольшим количеством сывороток из коллекции. Это можно объяснить различной иммуногенностью вирусных эпитопов, их представленностью иммунной системе человека. Отличительной особенностью оболочечного белка gp120 ВИЧ является высокая степень гликолизации. Это позволяет вирусу уйти от распознавания иммунной системой и выработки нейтрализующих антител [14]. Поэтому не все сыворотки содержат антитела, направленные к этим эпитопам, и с этим связано различное распознавание синтетических пептидов сыворотками в ИФА.

Изучение биологических свойств пептидов выявило их способность усиливать проникновение псевдовиральных частиц, относящихся к разным вирусным изолятам и субтипам, в клетку. Данный феномен уже описывался С. Zanotto et al. Авторами было показано, что V3-пептид (штамм MN) был способен связываться с CD4-растворимым рецептором в области связывания V1-/V2-петли. При этом было установлено, что лишь пептиды с незамещенным позитивным зарядом (т.е. копирующие V3-петлю) были способны увеличивать экспрессию молекул CD4 на поверхности клеток (без дополнительного синтеза) и таким образом повышать пул про-

кающих в клетку вирусных частиц. Поэтому при разработке терапевтических вакцин на основе пептидов, имитирующих V3-петлю, следует провести более детальные исследования в отношении структуры, длины и других биологических свойств пептидов, избираемых в качестве кандидатных иммуногенов [19].

Иммунизация лабораторных животных вызвала образование антител на все пептиды, входящих в состав смеси. Т.к. пептиды сами по себе являются слабыми иммуногенами, то для усиления иммунного был использован иммуноадъювант – ПАФ. Все пептиды индуцировали образование специфических антител. Титр антител на каждый пептид зависел от протяженности пептида, его молекулярной массы. Несмотря на достаточно высокий титр, полученные антитела не распознавали белки культурального вируса в иммуноблоте и не обладали нейтрализующей активностью.

Нейтрализация вируса – достаточно сложный процесс, на который влияет ряд факторов: количество антител (титр), изотип антител, строение самих антител. Показано, что антитела подкласса IgG1 и IgG3 ассоциированы с нейтрализацией ВИЧ, ADCC/ADCVI, фиксацией комплемента и связыванием FcR [15]. Использование различных иммуноадъювантов позволяет переключать синтез подклассов антител. Возможно, для индукции нейтрализующих антител данной смесью пептидных антигенов необходимо провести подбор иммуноадъювантов и способов иммунизации. Работа в данном направлении будет продолжена.

Список литературы / References

1. Chavez L., Calvanese V., Verdin E. HIV Latency Is Established Directly and Early in Both Resting and Activated Primary CD4 T Cells. *Plos Pathog.*, 2015, Vol. 11, no. 6, e1004955.
2. Duerr A., Huang Y., Buchbinder S., Coombs R.W., Sanchez J., del Rio C., Casapia M., Santiago S., Gilbert P., Corey L., Robertson M.N. Extended follow-up confirms early vaccine-enhanced risk of HIV acquisition and demonstrates waning effect over time among participants in a randomized trial of recombinant adenovirus HIV vaccine (Step Study). *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 206, no. 2, pp. 258-266.
3. Dettin M., Scarinci C., Zanotto C., Roncon R., De Rossi A., Di Bello C. Biological and conformational studies on analogues of a synthetic peptide enhancing HIV-1 infection. *J. Pept. Sci.*, 1998, Vol. 4, no. 7, pp. 436-448.
4. Deng H., Liu R., Ellmeier W., Choe S., Unutmaz D., Burkhardt M., Di Marzio P., Marmon S., Sutton R.E., Hill C.M., Davis C.B., Peiper S.C., Schall T.J., Littman D.R., Landau N.R. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature*, 1996, Vol. 381, pp. 661-666.
5. Díez-Fuertes F., Cabello M., Thomson M.M. Bayesian phylogeographic analyses clarify the origin of the HIV-1 subtype A variant circulating in former Soviet Union's countries. *Infect. Genet. Evol.* 2015, pii: S1567-1348(15)00165-3.

6. Edlefsen P.T., Rolland M., Hertz T., Tovanabutra S., Gartland A.J., deCamp A.C., Magaret C.A., Ahmed H., Gottardo R., Juraska M., McCoy C., Larsen B.B., Sanders-Buell E., Carrico C., Menis S., Bose M., Arroyo M.A., O'Connell R.J., Nitayaphan S., Pitisuttithum P., Kaewkungwal J., Rerks-Ngarm S., Robb M.L., Kirys T., Georgiev I.S., Kwong P.D., Scheffler K., Pond S.L., Carlson J.M., Michael N.L., Schief W.R., Mullins J.I., Kim J.H., Gilbert P.B. Comprehensive sieve analysis of breakthrough HIV-1 sequences in the RV144 vaccine efficacy trial. *PLoS Comput. Biol.*, 2015, Vol. 11, no. 2, e.1003973.
7. Haynes B.F., Gilbert P.B., McElrath M.J., Zolla-Pazner S., Tomaras G.D., Alam S.M., Evans D.T., Montefiori D.C., Karnasuta C., Sutthent R., Liao H.X., DeVico A.L., Lewis G.K., Williams C., Pinter A., Fong Y., Janes H., DeCamp A., Huang Y., Rao M., Billings E., Karasavvas N., Robb M.L., Ngauy V., de Souza M.S., Paris R., Ferrari G., Bailer R.T., Soderberg K.A., Andrews C., Berman P.W., Frahm N., De Rosa S.C., Alpert M.D., Yates N.L., Shen X., Koup R.A., Pitisuttithum P., Kaewkungwal J., Nitayaphan S., Rerks-Ngarm S., Michael N.L., Kim J.H. Immune-correlates analysis of an HIV-1 vaccine efficacy trial. *N. Engl. J. Med.*, 2012., Vol. 366, pp. 1275-1286.
8. Henrich T.J., Kuritzkes D.R. HIV-1 entry inhibitors: recent development and clinical use. *Curr. Opin. Virol.*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 51-77.
9. Julien J.P., Sok D., Khayat R., Lee J.H., Doores K.J., Walker L.M., Ramos A., Diwanji D.C., Pejchal R., Cupo A., Katpally U., Depetris R.S., Stanfield R.L., McBride R., Marozsan A.J., Paulson J.C., Sanders R.W., Moore J.P., Burton D.R., Poignard P., Ward A.B., Wilson I.A. Broadly neutralizing antibody PGT121 allosterically modulates CD4 binding via recognition of the HIV-1 gp120 V3 base and multiple surrounding glycans. *PLoS Pathog.*, 2013, Vol. 9, no. 5, e1003342.
10. Liao H.X., Sutherland L.L., Xia S.M., Brock M.E., Scarce R.M., Vanleeuwen S., Alam S.M., McAdams M., Weaver E.A., Camacho Z., Ma B.J., Li Y., Decker J.M., Nabel G.J., Montefiori D.C., Hahn B.H., Korber B.T., Gao F., Haynes B.F. A group M consensus envelope glycoprotein induces antibodies that neutralize subsets of subtype B and C HIV-1 primary viruses. *Virology*, 2006, Vol. 353, no. 2, pp. 268-282.
11. Montefiori D.C. Measuring HIV neutralization in a luciferase reporter gene assay. *Methods Mol. Biol.*, 2009, Vol. 485, pp. 395-405.
12. Peeters M., D'Arc M., Delaporte E. Origin and diversity of human retroviruses. *AIDS Rev.*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 23-34.
13. Sarzotti-Kelsoe M., Bailer R.T., Turk E., Lin C.L., Bilaska M., Greene K.M., Gao H., Todd C.A., Ozaki D.A., Seaman M.S., Mascola J.R., Montefiori D.C. Optimization and validation of the TZM-bl assay for standardized assessments of neutralizing antibodies against HIV-1. *J. Immunol. Methods*, 2014, Vol. 409, pp. 131-146.
14. Sagar M., Wu X., Lee S., Overbaugh J. Human immunodeficiency virus type 1 V1-V2 envelope loop sequences expand and add glycosylation sites over the course of infection, and these modifications affect antibody neutralization sensitivity. *J. Virol.*, 2006, Vol. 80, no. 19, pp. 9586-9598.
15. Tomaras G.D., Haynes B.F. Strategies for eliciting HIV-1 inhibitory antibodies. *Curr. Opin. HIV AIDS*, 2010, Vol. 5, no. 5, pp. 421-427.
16. Trkola A., Purtscher M., Muster T., Ballaun C., Buchacher A., Sullivan N., Srinivasan K., Sodroski J., Moore J.P., Katinger H. Human monoclonal antibody 2G12 defines a distinctive neutralization epitope on the gp120 glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J. Virol.*, 1996, Vol. 70, no. 2, pp. 1100-1108.
17. Watkins J.D., Siddappa N.B., Lakhashe S.K., Humbert M., Sholukh A., Hemashettar G., Wong Y.L., Yoon J.K., Wang W., Novembre F.J., Villinger F., Ibegbu C., Patel K., Corti D., Agatic G., Vanzetta F., Bianchi S., Heeney J.L., Sallusto F., Lanzavecchia A., Ruprecht R.M. An anti-HIV-1 V3 loop antibody fully protects cross-clade and elicits T-cell immunity in macaques mucosally challenged with an R5 clade C SHIV. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 3, e18207.
18. Yates N.L., Liao H.X., Fong Y., deCamp A., Vandergrift N.A., Williams W.T., Alam S.M., Ferrari G., Yang Z.Y., Seaton K.E., Berman P.W., Alpert M.D., Evans D.T., O'Connell R.J., Francis D., Sinangil F., Lee C., Nitayaphan S., Rerks-Ngarm S., Kaewkungwal J., Pitisuttithum P., Tartaglia J., Pinter A., Zolla-Pazner S., Gilbert P.B., Nabel G.J., Michael N.L., Kim J.H., Montefiori D.C., Haynes B.F., Tomaras G.D. Vaccine-induced Env V1-V2 IgG3 correlates with lower HIV-1 infection risk and declines soon after vaccination. *Sci. Transl. Med.*, 2014, *Sci. Transl. Med.*, Vol. 6, no. 228, p. 228ra39.
19. Zanutto C., Calderazzo F., Dettin M., Di Bello C., Autiero M., Guardiola J., Chieco-Bianchi L., De Rossi A. Minimal sequence requirements for synthetic peptides derived from the V3 loop of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) to enhance HIV-1 binding to cells and infection. *Virology*, 1995, Vol. 206, no. 2, pp. 807-816.
20. Zolla-Pazner S., deCamp A., Gilbert P.B., Williams C., Yates N.L., Williams W.T., Howington R., Fong Y., Morris D.E., Soderberg K.A., Irene C., Reichman C., Pinter A., Parks R., Pitisuttithum P., Kaewkungwal J., Rerks-Ngarm S., Nitayaphan S., Andrews C., O'Connell R.J., Yang Z.Y., Nabel G.J., Kim J.H., Michael N.L., Montefiori D.C.,

Liao H.X., Haynes B.F., Tomaras G.D. Vaccine-induced IgG antibodies to V1V2 regions of multiple HIV-1 subtypes correlate with decreased risk of HIV-1 infection. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, e87572.

21. Zolla-Pazner S. Identifying epitopes of HIV-1 that induce protective antibodies. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 3, pp. 199-210.

Авторы:

Коробова С.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория полисахаридных вакцин, отдел иммунной биотехнологии ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

Корнилаева Г.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория иммунохимии, отдел молекулярной вирусологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Топорова В.А. — младший научный сотрудник, лаборатория инженерии белка, отдел биоинженерии ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Николаева И.А. — д.б.н., ведущий научный сотрудник, отдел планирования и координации научных исследований ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

Трубченинова Л.П. — к.б.н., заведующая лабораторией диагностики иммунозависимых заболеваний, отдел иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

Трефильева Н.Ф. — врач лаборатории диагностики иммунозависимых заболеваний, отдел иммунодиагностики и иммунокоррекции ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

Сизякина Л.П. — д.м.н., профессор, директор, Научно-исследовательский институт иммунологии Ростовского государственного медицинского университета Министерства здравоохранения РФ, г. Ростов-на-Дону, Россия

Сидорович И.Г. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник, информационно-аналитический отдел ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

Апарин П.Г. — д.м.н., заведующий лабораторией полисахаридных вакцин, отдел иммунной биотехнологии ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

Хаитов Р.М. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель, ФГБУ «Государственный научный центр «Институт иммунологии»» ФМБА России, Москва, Россия

Authors:

Korobova S.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Polysaccharide Vaccines, Department of Immune Biotechnology, Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Kornilaeva G.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Immunochemistry, Department of Molecular Virology, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation

Toporova V.A., Junior Research Associate, Laboratory of Protein Engineering, Department of Bioengineering, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Nikolaeva I.A., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Department of Scientific Research Planning and Coordination, Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Trubcheninova L.P., PhD (Biology), Head, Immune Disease Diagnosis Laboratory, Department of Immunodiagnosis and Immune Correction, Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Trefilyeva N.F., Laboratory medical adviser, Immune Disease Diagnosis Laboratory, Department of Immunodiagnosis and Immune Correction, Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Sizyakina L.P., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Immunology, Rostov State Medical University, Rostov-on-Don, Russian Federation

Sidorovich I.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief Research Associate, Information and Analysis Department, Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Aparin P.G., PhD, MD (Medicine), Head, Polysaccharide Vaccines Laboratory, Department of Immune Biotechnology, Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Khaitov R.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief of Research, Institute of Immunology, Federal Medico-Biological Agency, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.07.2015
Принята к печати 30.08.2015

Received 01.07.2015
Accepted 30.08.2015

СПОНТАННАЯ И ЛПС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦИРРОЗОМ ПЕЧЕНИ В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

**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. Исследовали уровень продукции 26 цитокинов, секретируемых клетками крови больных циррозом печени (ЦП; $n = 20$), в динамике проведения клеточной терапии (КТ). Курс КТ включал в/в инфузию аутологичных костномозговых МНК в дозе $1,3 \pm 0,3 \times 10^9$ (Ме $1,0 \times 10^9$) и через 14 сут. – в/в инфузию генерированных *in vitro* МСК в дозе $22,3 \pm 5,0 \times 10^6$ (Ме $16,0 \times 10^6$). Больные были обследованы 3-кратно: до начала КТ, через 2-3 сут. после введения МНК и по завершении КТ (через 2-3 сут. после введения МСК). Цитокин-секреторную функцию клеток цельной крови оценивали в 24-часовых культурах в отсутствие стимуляции и в ответ на липополисахарид (ЛПС). Группу контроля составили 10 здоровых доноров крови. Проведение КТ с использованием аутологичных костномозговых клеток (МНК и МСК) у больных ЦП не вызывало развития побочных (аллергических или токсических) реакций, было безопасным и хорошо переносимым. По сравнению с донорами больные ЦП (особенно класса В+С по Child-Pugh) отличались исходно повышенной продукцией ряда цитокинов и хемокинов. Так, отмечалось статистически значимое усиление спонтанной продукции IL-9, MIP-1 β и IP-10, а также отчетливый тренд к возрастанию TNF α , IL-1 α , IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MCP-1, MIP-1 α , RANTES и Eotaxin. При этом клетки крови больных ЦП сохраняли чувствительность к стимулирующему действию ЛПС. Так, продукция 11 из 26 цитокинов (IL-1 α , IL-6, IL-9, IL-15, IL-17, IL-7, IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , Eotaxin) в ответ на ЛПС значительно превышала нормативные значения. Трансплантация костномозговых МНК оказывала минимальное влияние на продукцию цитокинов. В то же время введение МСК приводило к статистически значимому снижению спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции, соответственно, 20 и 18 из 26 анализов, включая про-/противовоспалительные и иммунорегуляторные цитокины, хемокины и ростовые факторы. Нормализация цитокин-секреторной функции у больных ЦП после трансплантации МСК свидетельствует об ослаблении воспалительной активности клеток крови и снижении их реактивности к эндотоксину. Супрессивный эффект МСК на продукцию цитокинов был дозозависимым и наиболее ярко проявлялся у пациентов с декомпенсированным (класс В+С по Child-Pugh) ЦП вирусной этиологии.

Ключевые слова: мультиплексный анализ, цитокины, клетки крови, цирроз печени, клеточная терапия, костномозговые МНК и МСК

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,
«Спонтанная и ЛПС-индуцированная продукция 26
цитокинов, секретируемых клетками крови больных
циррозом печени в динамике клеточной терапии»
// *Медицинская иммунология*, 2016. Т. 18, № 1. С. 63-78.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-63-78

© Останин А.А. и соавт., 2016

For citation:

A.A. Ostanin, N.M. Starostina, I.V. Meledina, M.V. Shipunov,
O.Yu. Leplina, E.Ya. Shevela, E.R. Chernykh, "Spontaneous
and LPS-induced production of 26 cytokines secreted by blood
cells of patients with liver cirrhosis during of cell therapy", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18,
no. 1, pp. 63-78. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-63-78

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-63-78>

SPONTANEOUS AND LPS-INDUCED PRODUCTION OF 26 CYTOKINES SECRETED BY BLOOD CELLS OF PATIENTS WITH LIVER CIRRHOSIS DURING OF CELL THERAPY

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. The objective of the present study was to assess the level of 26 cytokines secreted by peripheral blood cells of the patients with liver cirrhosis (LC; n = 20) during the cell therapy (CT). All the patients were administered with intravenously injected autologous bone marrow-derived mononuclear cells (MNCs) in a dose of $1.3 \pm 0.3 \times 10^9$ (Me 1.0×10^9) followed by 14 days later intravenous injection of ex vivo generated mesenchymal stromal cells (MSCs) in a dose of $22.3 \pm 5.0 \times 10^6$ (Me 16.0×10^6). The patients were examined before the CT, 2-3 days after the administration of MNCs and, then, 2-3 days after the introduction of MSCs. Cytokine-secretory function of peripheral blood cells was evaluated in a 24-hour whole blood cultures both in the absence of any stimulation and in response to lipopolysaccharide (LPS). The control group consisted of 10 healthy donors. The administration of patients' bone marrow cells (both MNCs and MSC) was safe and well tolerated and caused no any adverse (toxic or allergic) events. Compared with donors, LC patients (especially, with class B+C by Child-Pugh) differed by an initially increased production of several cytokines and chemokines. Actually, there was a statistically significant increase of the spontaneous production of IL-9, MIP-1 β , and IP-10, as well as a distinct trend to an increase in TNF α , IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, of MCP-1, MIP-1 α , RANTES and Eotaxin. Moreover, the blood cells of LC patients were susceptible to the stimulatory effect of LPS, and the LPS-induced production of 11 out of 26 cytokines (IL-1ra, IL-6, IL-9, IL-15, IL-17, IL-7, IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , Eotaxin) significantly exceeded the normative values. Transplantation of bone marrow MNCs had minimal impact on cytokine production. Meanwhile, the MSCs introduction resulted in a significant decrease in spontaneous and LPS-induced production of, respectively, 20 and 18 analytes including pro-/anti-inflammatory and immunoregulatory cytokines, chemokines and growth factors. The normalization of cytokine-secretory function following transplantation of MSCs revealed in the patients with LC indicates the weakening of an inflammatory activity of circulating blood cells and the decrease in their reactivity to endotoxin. MSC suppressive effect on cytokine production was dose-dependent, and most pronounced in patients with decompensated LC (class B+C by Child-Pugh) of viral etiology.

Keywords: multiplex assay; cytokines; blood cells; liver cirrhosis; cell therapy; bone marrow MNC & MSC

Введение

Среди различных подходов к лечению цирроза печени (ЦП) трансплантация костномозговых клеток (КМК) привлекает большое внимание. В отличие от трансплантации печени, признанной сегодня единственным эффективным методом лечения цирроза, данная стратегия не лимитирована наличием донорского органа, не требует иммуносупрессивной терапии и может рассматриваться в качестве временного пособия или альтернативы органной трансплантации [9, 17, 43, 49].

Экспериментальные исследования в модели ЦП показали, что КМК способны мигрировать и интегрироваться в поврежденной печени, улучшая ее функции, и что позитивный эффект КМК ассоциирован с подавлением апоптоза гепато-

цитов, дифференцировкой трансплантируемых и эндогенных стволовых/прогениторных клеток в гепатоциты, подавлением фиброза и активацией фибролиза [35, 43, 44, 46, 51]. Несмотря на то, что точные механизмы действия КМК до конца не ясны, успешные доклинические исследования при отсутствии эффективных методов лечения ЦП послужили поводом для активных клинических испытаний. Их результаты показали безопасность трансплантации КМК и способность трансплантируемых клеток улучшать функции печени, что проявляется возрастанием сывороточного альбумина и снижением тяжести цирроза у больных с гепатитами вирусной и токсической этиологии [21, 23, 29, 33, 42, 50].

Центральная роль в патогенезе ЦП отводится воспалительному процессу, который поддержи-

ваются иммунными клетками и коррелирует с тяжестью и осложнениями ЦП [19, 34, 58]. Фиброз является ответной реакцией на хроническое воспаление, и подавление воспалительной активности представляется важной мишенью в лечении ЦП [24, 41, 45]. В этой связи было высказано предположение, что клинический эффект КМК может быть в значительной степени обусловлен их иммуномодулирующей активностью. Особый интерес в этом плане привлекли мезенхимальные стромальные клетки (МСК), которые наряду с их широким дифференцировочным потенциалом способны оказывать противовоспалительный эффект и обладают анти-апоптотической и анти-фибротической активностью [27, 32, 37, 54].

Действительно, клинические испытания МСК при ЦП показали безопасность их внутривенного введения и улучшение показателей функции печени в течение нескольких месяцев после трансплантации [22, 33, 38, 59].

Ранее нами были проведены пилотные клинические исследования, которые показали безопасность и эффективность трансплантации КМК у больных ЦП [2, 4]. Учитывая потенциальную роль МСК в ограничении воспаления, был разработан новый протокол терапии ЦП, включающий комбинацию мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга с последующим введением аутологичных МСК. Клинические исследования показали безопасность и улучшение функций печени на фоне введения МНК и МСК [5]. Тем не менее, вопрос о способности вводимых клеток оказывать противовоспалительный эффект и сравнительной характеристике иммуномодулирующего эффекта МНК и МСК остается открытым.

Целью настоящего исследования явилась характеристика иммуномодулирующего эффекта клеточной терапии, в том числе в сравнении краткосрочных эффектов МНК и МСК. Для этого у 20 пациентов, рекрутированных в исследование, до начала терапии, после введения МНК и после инфузии МСК оценивалась продукция 26 цитокинов клетками крови.

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 не-вирусной 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). Клеточную терапию (КТ) и лабораторный мониторинг, одобренные решением Локального этического комитета, проводили после получения письменного информированного согласия больных.

Критериями включения в исследование являлись: 1) клинический диагноз ЦП, подтвержденный гистологическим исследованием; 2) возраст не старше 70 лет; 3) наличие письменного информированного согласия. Критерии исключения: 1) несоответствие критериям включения; 2) активный алкоголизм, употребление наркотических средств; 3) ВИЧ-инфекция, СПИД; 4) декомпенсированные заболевания легких и сердца; 5) кровотечение из варикозно-расширенных вен пищевода или спонтанный перитонит при госпитализации; 6) наличие гепатоцеллюлярной карциномы или других онкологических заболеваний; 7) острые инфекции; 8) тромбоцитопения (ниже $50 \times 10^9/\text{л}$); 9) психические нарушения; 10) неспособность пациента подписать информированное согласие. Базисная терапия включала проведение детоксикационной терапии и назначение гепатозащитных средств, антиоксидантов, пищеварительных ферментов и диуретиков (при наличии асцита и отеков).

В соответствии с утвержденным протоколом, у больного в условиях операционной при проведении трепанобиопсии из крыла подвздошной кости получали аспират костного мозга. Дальнейшие манипуляции по сепарации и культивированию клеток проводились в условиях лаборатории на основе лицензий на трансплантацию костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (ФС-54-01-002049) и применение клеточных технологий (ФС-54-01-001780). Фракцию МНК костного мозга выделяли стандартно в градиенте плотности фикола-верографина. Затем основную часть (70-80%) полученных костномозговых МНК ресуспендировали в 200 мл 0,9% раствора натрия хлорида с 5% альбумина и в этот же день вводили пациенту внутривенно капельно. Остальные МНК использовали для генерации МСК в соответствии с рекомендациями по получению клеточных продуктов мезенхимального происхождения [10]. Кратко: костномозговые МНК культивировали в течение 14 дней в питательной

среде а-МЕМ с 10% сыворотки телят в условиях CO₂-инкубатора, обновляя среду каждые 3-4 дня. За сутки до окончания культивирования культуральную среду, содержащую сыворотку телят, замещали средой, содержащей 10% аутологичной сыворотки пациента. Через 24 ч клеточный монослой дважды отмывали 0,9% раствором хлорида натрия и подвергали трипсинизации с использованием 0,25% раствора трипсина с версеном (1:1). Полученные МСК подсчитывали и оценивали жизнеспособность клеток с использованием трипанового синего. Затем МСК ресуспендировали в 50 мл 0,9% раствора натрия хлорида с 5% альбумина и вводили пациенту внутривенно капельно.

Больные ЦП были обследованы 3-кратно: до начала клеточной терапии (n = 20), через 2-3 сут. после введения МНК (n = 20) и по завершении КТ (через 2-3 сут. после введения МСК, n = 15). 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, 5 мМ 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-1β, 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, IFNγ, IP-10, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, PDGF-BB, RANTES, TNFα, 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, 12]. 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 раз-

личий использовали непараметрические критерии: Вилкоксона–Манна–Уитни и Вилкоксона (для связанных выборок). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмана (r_s). Для оценки различий по уровню какого-либо признака между несколькими (> 2) выборками проводили дисперсионный однофакторный анализ с использованием непараметрического Н-критерия Краскела–Уоллиса.

Результаты

Курс КТ включал в/в инфузию костномозговых МНК в дозе $1,3 \pm 0,3 \times 10^9$ клеток (Me $1,0 \times 10^9$; интерквартильный диапазон $0,37-2,1 \times 10^9$) и через 14 сут. – в/в инфузию генерированных *in vitro* МСК в дозе $22,3 \pm 5,0 \times 10^6$ клеток (Me $16,0 \times 10^6$; интерквартильный диапазон $10,3-27,4 \times 10^6$). По данным проточной цитофлюориметрии количество CD34⁺ и CD34⁺38⁻ клеток в популяции костномозговых МНК составляло $4,6 \pm 0,5$ и $0,6 \pm 0,08\%$ соответственно. Популяция МСК содержала 85-95% клеток, экспрессирующих специфичные маркеры (CD73, CD90, CD105), и минимальное количество клеток, экспрессирующих «линейные» маркеры: CD3 ($3,9 \pm 1,55\%$), CD20 ($5,3 \pm 1,30\%$), CD16 ($5,6 \pm 1,72\%$), CD14 ($5,6 \pm 2,28\%$), HLA-DR ($1,1 \pm 0,57\%$) и CD34 ($0,69 \pm 0,28\%$). Жизнеспособность клеток была не менее 95-97%. Проведение клеточной терапии с использованием аутологичных костномозговых клеток (МНК и МСК) у больных ЦП не вызывало развития побочных (аллергических или токсических) реакций, было безопасным и хорошо переносимым.

Сравнительная оценка параметров общего и биохимического анализов крови больных ЦП в динамике проводимой терапии показала, что по завершении КТ снижался уровень трансаминаз (АСТ – с 79 до 50 Ед/л, $p_U = 0,15$; и АЛТ с 72 до 43 Ед/л, $p_U < 0,05$) и нормализовалось абсолютное количество циркулирующих лейкоцитов (с $4,9$ до $7,6 \times 10^9$ /л; $p_U < 0,05$). В то же время исходные изменения большинства других показателей, характеризующих известные лабораторные синдромы фиброзного поражения печени, имели относительно стойкий характер и за столь короткий срок наблюдения (в среднем 16-17 сут.) значительно не менялись.

Для исследования цитокин-секреторной функции клеток крови больных ЦП нами был использован методический прием, основанный на оценке уровня спонтанной и ЛПС-стимулированной продукции 26 цитокинов

в 24-часовых культурах цельной крови. Полученные значения уровня цитокинов (пг/мл) были стандартизированы по количеству клеток-продуцентов (пг/мл/10⁶ лейкоцитов). Кроме того, для удобства восприятия материала, анализируемые 26 цитокинов были разбиты на 4 подгруппы

(семейства): про/противовоспалительные цитокины (n = 4); иммунорегуляторные Th1-/Th2-/Th9-/Th17-цитокины (n = 10); ростовые факторы (n = 5) и хемокины (n = 7).

По сравнению с донорами клетки крови больных ЦП отличались более высокой спонтанной

ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦП В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Группы	Цитокины	Спонтанная продукция (пг/мл/10 ⁶ лейкоцитов)			
		Доноры (n = 10)	Больные ЦП до начала КТ (n = 20)	Через 2-3 сут. (n = 20)	По завершении КТ (n = 15)
Про- и противовоспалительные	IL-1 β	38 (8-59)	35 (18-66)	31 (8,5-53)	13,4 (4,3-27) [#]
	TNF α	42 (20-77)	89 (30-125)	65 (15-97)	40 (10-82) [#]
	IL1-ra	53 (24-88)	82 (45-130)	66 (38-94)	29 (17-63) ^{##}
	IL-10	3,9 (3,4-8,1)	8 (4-12)	6,1 (3,6-9)	4,0 (2,0-7) [#]
Иммунорегуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	0,5 (0,4-0,7)	0,6 (0,5-0,9)	0,6 (0,4-0,8)	0,4 (0,2-0,6) [#]
	IFN γ	204 (189-312)	202 (136-361)	179 (126-252)	97 (52-170) ^{**.} ^{##}
	IL-12	4,9 (2,2-6,8)	3,0 (1,6-6,9)	5,2 (1,4-7)	3,0 (1,3-6)
	IL-4	9,4 (7,7-10,8)	12,3 (10-15,4)	11,7 (8,1-15,3)	5,6 (3,8-9,6) ^{##}
	IL-5	0,7 (0,5-0,8)	1,2 (0,9-1,5)	0,9 (0,7-1,7)	0,7 (0,3-0,9) ^{##}
	IL-6	493 (103-939)	897 (493-1489)	755 (430-1340)	559 (88-733) [#]
	IL-9	7,5 (6,2-11)	19 (7,6-44) [*]	20,2 (10,6-31) ^{**}	9,6 (5,1-24)
	IL-13	4,6 (4-5,2)	5,7 (2,5-8)	3,4 (2,0-5,5)	2,4 (1,8-4,7) [#]
	IL-15	4,6 (2,5-7,6)	7,5 (4-11,4)	5,0 (3,1-9,8)	3,6 (1,6-5,9) [#]
IL-17	0,9 (0,5-4,9)	3,1 (1,5-13,6)	1,3 (0,9-6,8)	1,6 (0,9-3,6)	
Ростовые факторы	G-CSF	9,6 (7-31)	16,7 (7-37)	8,2 (3,1-28)	10,4 (3,8-22)
	IL-7	8,1 (1,7-11,5)	8,0 (1,7-14,1)	6,2 (1,9-14)	2,6 (1,0-4,9) [#]
	FGF-b	0,5 (0,3-0,6)	0,7 (0,5-1,7)	0,8 (0,5-1,0)	0,5 (0,2-0,7) [#]
	PDGF	133 (85-153)	136 (55-210)	122 (58-284)	76 (28-139) ^{*.} [#]
	VEGF	16,3 (1,6-36)	7,5 (2,6-27)	11 (1,6-29)	4,8 (1,9-24)
СХС- и СС-хемокины	IL-8	1940 (956-2193)	2175 (1276-3653)	1996 (1388-3844)	1124 (472-2244) [#]
	IP-10	94 (49-178)	361 (245-970) [*]	400 (170-1157) ^{**}	144 (73-214) ^{##}
	MCP-1	899 (527-1490)	1402 (830-2258)	1332 (788-2718)	982 (396-1854)
	MIP-1 α	58 (24-131)	135 (73-276)	102 (68-197)	76 (20-130) [#]
	MIP-1 β	431 (190-507)	810 (400-1840) [*]	788 (526-1720) ^{**}	363 (238-1058) [#]
	RANTES	473 (346-529)	658 (430-1046)	486 (331-857)	383 (198-538) [#]
	Eotaxin	64 (48-77)	88 (69-140)	73 (54-115)	48 (33-88) [#]

Примечание. Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). * – p < 0,05 и ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с донорами; # – p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

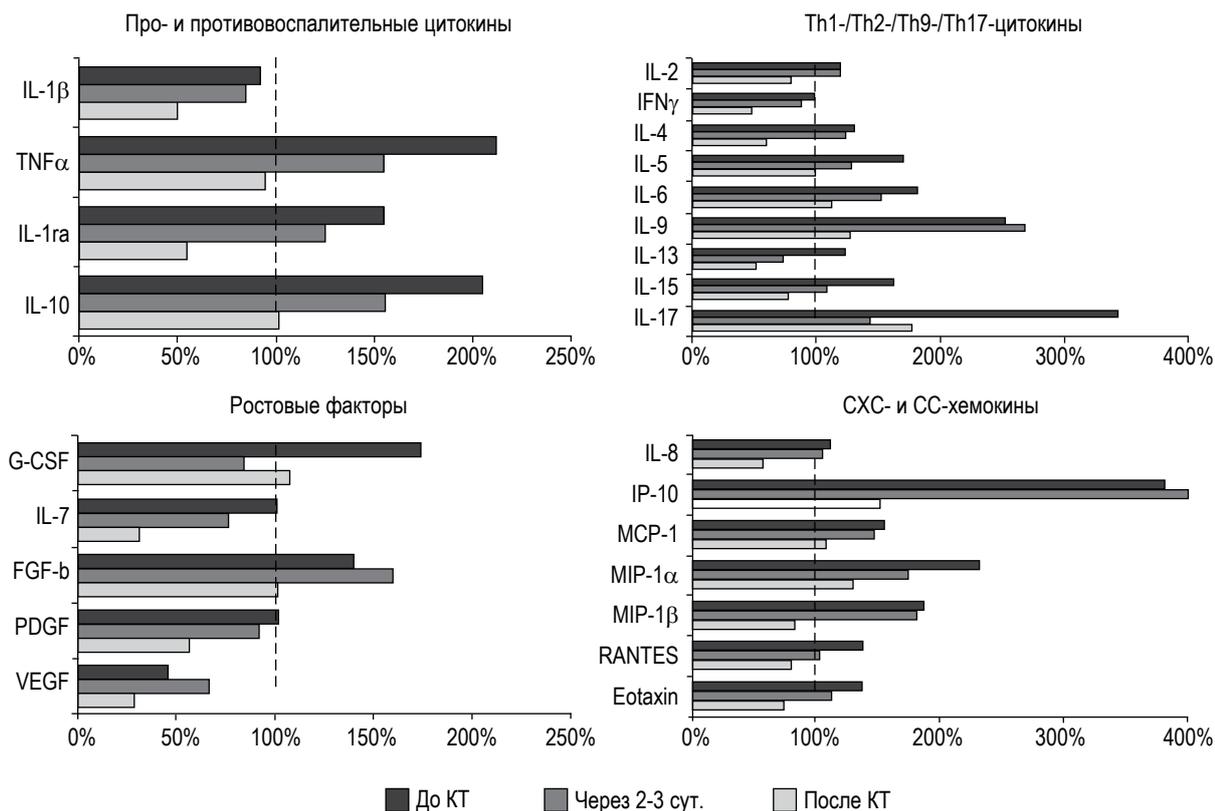


Рисунок 1. Изменение уровня спонтанной продукции цитокинов клетками крови больных ЦП в динамике клеточной терапии (КТ)

Примечание. Здесь и на рисунке 2 данные представлены в виде %, рассчитанного относительно среднего уровня здоровых доноров, принятого за 100% (пунктирная линия) по формуле:

$(\text{Ме цитокинов у больных ЦП} / \text{Ме цитокинов у доноров}) \times 100\%$.

продукцией цитокинов из всех 4 функциональных групп. Усиление спонтанной продукции $\text{TNF}\alpha$, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MCP-1, MIP-1 α , RANTES и Eotaxin проявлялось в виде тенденции, тогда как возрастание IL-9, MIP-1 β и IP-10 было статистически значимым (табл. 1). Через 2-3 сут. после введения костномозговых МНК характер спонтанной секреции цитокинов клетками крови больных ЦП значимо не менялся. Тем не менее регистрировалось умеренное снижение исходно повышенной продукции $\text{TNF}\alpha$, IL-1ra, IL-4, IL-5, IL-6, IL-13, MIP-1 α и RANTES.

По завершении курса КТ, т.е. через 2-3 сут. после введения МСК, регистрировалось статистически достоверное снижение большинства цитокинов (20/26), включая про/противовоспалительные (4/4) и иммунорегуляторные цитокины (7/10), хемокины (6/7) и ростовые факторы (3/5). Характерно, что продукция этих цитокинов снижалась до уровня нормы и не отличалась от донорских значений, за исключением $\text{IFN}\gamma$ и PDGF, средний уровень которых по сравнению с донорами был снижен. Диаграммы, представленные на рисунке 1, дополнительно иллюстри-

руют изменение спонтанной продукции цитокинов у больных ЦП в динамике КТ относительно среднего уровня здоровых доноров, принятого за 100%.

Хорошо известно, что практически все гены цитокинов являются индуцибельными. Для того чтобы оценить секреторный потенциал клеток-продуцентов в условиях митогенной стимуляции, мы использовали бактериальный ЛПС (эндотоксин), который активирует лейкоциты (гранулоциты, лимфоциты, моноциты) через TLR4. Из данных таблицы 2 видно, что по сравнению с донорами у больных ЦП отмечалось значимое усиление ЛПС-стимулированной продукции 11 из 26 цитокинов – IL-1ra, IL-6, IL-9, IL-15, IL-17, IL-7, IL-8, IP-10, MIP-1 α , MIP-1 β , Eotaxin. Введение костномозговых МНК значимо не меняло ЛПС-стимулированную продукцию цитокинов по сравнению с исходным уровнем. Тем не менее, после введения МНК отмечалось умеренное ослабление индуцированной продукции IL-17 и Eotaxin, уровень которых уже не отличался от нормативного. Вместе с тем продукция 3 цитокинов (G-CSF, IL-10 и VEGF) уси-

ТАБЛИЦА 2. ЛПС-ИНДУЦИРОВАННАЯ ПРОДУКЦИЯ 26 ЦИТОКИНОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ КЛЕТКАМИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ЦП В ДИНАМИКЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ

Группы	Цитокины	ЛПС-индуцированная продукция (пг/мл/10 ⁶ лейкоцитов)			
		Доноры (n = 10)	Больные ЦП до начала КТ (n = 20)	Через 2-3 сут. (n = 20)	По завершении КТ (n = 15)
Про- и противовоспалительные	IL-1 β	431 (285-500)	529 (314-1066)	652 (290-770)	261 (138-460) [#]
	TNF α	848 (748-1187)	1310 (465-2157)	1705 (645-3606)	520 (297-1617) [#]
	IL-1-ra	239 (139-295)	424 (210-748) [*]	429 (292-547) [*]	247 (141-364) [#]
	IL-10	25 (13,7-58)	62 (20-177)	91 (48-157) [*]	46 (26-88)
Иммунорегуляторные цитокины (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	9,2 (5,6-11,1)	9,9 (1,3-17,4)	9,6 (5,0-11,7)	5,4 (2,7-10)
	IFN γ	483 (322-705)	520 (345-769)	545 (344-676)	268 (107-451) ^{##}
	IL-12	6,8 (4,6-11,2)	9,4 (6-24)	9,8 (5,8-18)	3,0 (2,2-5,3) ^{*,##}
	IL-4	15,2 (12,9-21,7)	21,3 (16,4-29,5)	23,2 (16,4-29)	13 (6,1-19) ^{##}
	IL-5	1,0 (0,7-2,8)	1,2 (0,8-1,8)	1,3 (0,9-2,2)	0,9 (0,4-1,1) [#]
	IL-6	2742 (1813-3478)	5966 (2834-9410) [*]	7661 (4755-9131) ^{**}	4243 (1621-5204) [#]
	IL-9	14,4 (11,1-15,5)	35 (22-50) ^{**}	25 (17-64) [*]	15 (11-32) [#]
	IL-13	5,3 (3,9-7,7)	6,5 (3,8-9,4)	6,5 (4,0-8,6)	3,5 (1,7-5,5) [#]
	IL-15	2,4 (0,9-3,1)	4,2 (2,1-6,7) [*]	3,5 (2,0-6,9) [*]	2,1 (1,3-3,0) [#]
	IL-17	24 (16,6-31,3)	39 (21-52) [*]	33 (18-53)	18 (11-39) [#]
Ростовые факторы	G-CSF	123 (48-145)	185 (83-311)	274 (193-420) ^{**}	203 (110-270)
	IL-7	3,4 (1,5-5,0)	6,4 (2,7-13) [*]	8,8 (3,0-11) [*]	2,3 (1,3-4,1) [#]
	FGF-b	2,5 (1,5-3,5)	3,7 (1,6-5,2)	3,4 (2,2-5,5)	1,7 (0,9-2,8) [#]
	PDGF	464 (309-587)	392 (118-582)	382 (255-577)	159 (105-405)
	VEGF	45,5 (36,5-57,5)	71 (41-88)	80 (51-115) [*]	33 (28-50) [#]
СХС- и СС-хемокины	IL-8	2383 (1922-3416)	3955 (2846-5854) [*]	4716 (2952-8347) [*]	2226 (1293-8369)
	IP-10	576 (292-743)	1090 (664-1697) [*]	951 (518-1765) [*]	250 (150-718) ^{##}
	MCP-1	211 (148-370)	331 (221-736)	344 (198-758)	164 (111-490)
	MIP-1 α	522 (454-674)	783 (547-1017) [*]	869 (582-1027) [*]	440 (263-883) [#]
	MIP-1 β	755 (497-944)	1611 (1133-2974) ^{**}	1875 (997-3753) ^{**}	1235 (771-2164)
	RANTES	811 (736-927)	1237 (544-1792)	1390 (635-1722)	656 (368-1854)
	Eotaxin	75 (60-92)	122 (78-144) [*]	95 (68-147)	67 (30-124) [#]

Примечание. Данные представлены в виде Median и интерквартильного диапазона (LQ-UQ). * – p < 0,05 и ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с донорами; # – p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (U – непараметрический критерий Вилкоксона –Манна–Уитни).

ливалась, и их уровень значимо превышал таковой у доноров.

По завершении курса КТ, т.е. через 2-3 сут. после введения МСК (табл. 2 и рис. 2) ЛПС-реактивность циркулирующих лейкоцитов у больных ЦП значимо снижалась. По сравне-

нию с исходными значениями регистрировалось уменьшение уровня секреции 18 из 26 цитокинов, включая Th1-/Th2-/Th9-/Th17-цитокины (9/10), ростовые факторы (3/5), хемокины (3/7) и про/противовоспалительные цитокины (3/4). За исключением IL-12 (продукция которого сни-

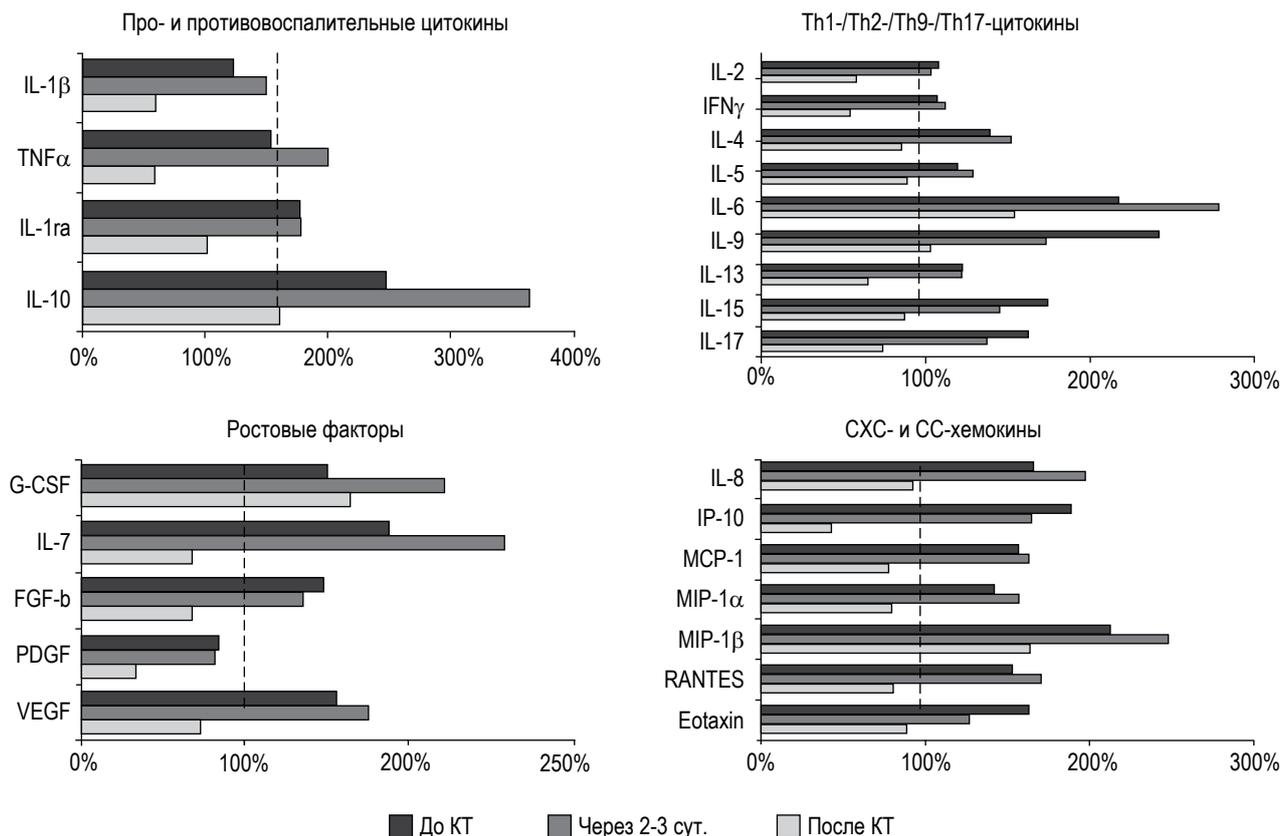


Рисунок 2. Изменение уровня ЛПС-индуцированной продукции цитокинов клетками крови больных ЦП в динамике клеточной терапии (КТ)

ТАБЛИЦА 3. ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ СПОНТАННОЙ И ЛПС-ИНДУЦИРОВАННОЙ ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ, ОТНОСЯЩИХСЯ К РАЗЛИЧНЫМ ФУНКЦИОНАЛЬНЫМ ГРУППАМ, У БОЛЬНЫХ ЦП В ДИНАМИКЕ ПРОВЕДЕНИЯ КТ

Продукция цитокинов	Группы цитокинов	До начала КТ	Через 2-3 сут. (после инфузии МНК)	По завершении КТ (2-3 сут. после инфузии МСК)
Спонтанная	Про- и противовоспалительные (n = 4)	180 (123-209)	140 (103-156)	75 (45-99)
	Th1/Th2/Th9/Th17 (n = 10)	147 (120-182)	122 (106-144)	79 (60-113)**.#
	Ростовые факторы (n = 5)	102 (99-140)	85 (76-92)	57 (32-100)*
	Хемокины (n = 7)	156 (138-233)	148 (103-183)	84 (75-131)*.#
ЛПС-индуцированная	Про- и противовоспалительные (n = 4)	166 (139-213)	190 (165-282)	82 (61-143)
	Th1/Th2/Th17 (n = 10)	139 (120-175)	141 (123-153)	80 (59-90)**.##
	Ростовые факторы (n = 5)	150 (148-156)	176 (136-223)	68 (67-72)*.#
	Хемокины (n = 7)	163 (153-189)	165 (157-198)	81 (78-93)*.#

Примечание. Данные (% , Me и интерквартильный диапазон) рассчитаны относительно среднего уровня продукции цитокинов клетками крови здоровых доноров, принятого за 100% по формуле: (Me цитокинов у больных ЦП / Me цитокинов у доноров) × 100%.

* – p < 0,05 и ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (до начала КТ);

– p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия по сравнению с показателями через 2-3 сут. после начала КТ (W – непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок).

жалась ниже нормы), профиль цитокинов, секретируемых клетками крови больных ЦП в ответ на эндотоксин, после окончания КТ достоверно не отличался от показателей здоровых доноров.

В обобщенном виде данные, характеризующие изменение относительного уровня спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов у больных ЦП в динамике проведения КТ представлены в таблице 3. Видно, что до начала лечения интенсивность продукции практически всех цитокинов, относящихся к различным семействам, у больных ЦП по сравнению с донорами была увеличена в среднем на 40-80% как в спонтанных, так и в ЛПС-стимулированных культурах. Исключением являлись ростовые факторы, базальная секреция которых была сопоставима с донорскими значениями. Очевидно, что циркулирующие лейкоциты больных ЦП *in*

situ находятся в функционально активном состоянии, поскольку способны спонтанно синтезировать различные цитокины/хемокины на более высоком уровне, чем клетки крови здоровых доноров. Несмотря на это лейкоциты, больных ЦП сохраняют ЛПС-реактивность, т.е. не находятся в состоянии анергии к эндотоксину.

Через 2-3 сут. после в/в инфузии аутологичных костномозговых МНК регистрировалось незначительное (примерно на 20%) снижение уровня спонтанной секреции про/противовоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов и ростовых факторов, тогда как ЛПС-индуцированная продукция либо значимо не менялась (Th1/Th2/Th1 цитокинов и хемокинов), либо даже усиливалась (про/противовоспалительных цитокинов и ростовых факторов). По завершении курса КТ, через 2-3 сут. после в/в инфузии аутологичных

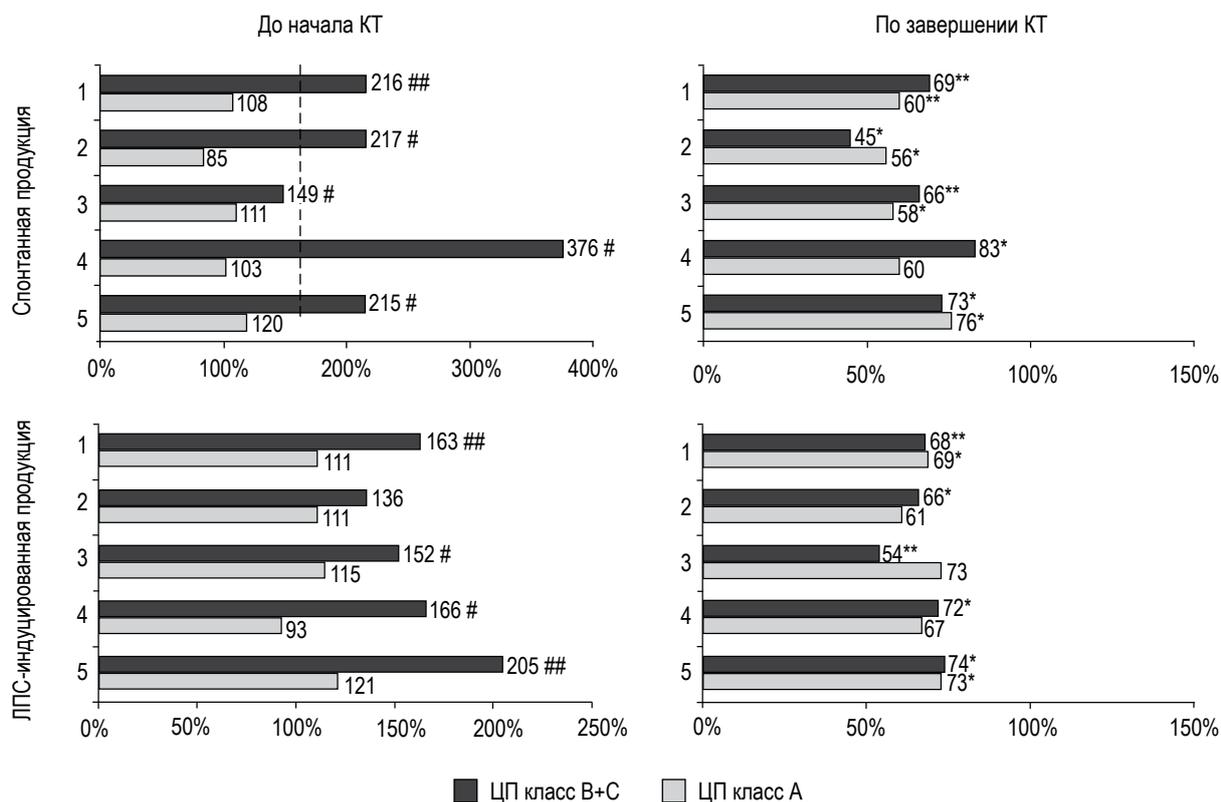


Рисунок 3. Изменение в динамике клеточной терапии уровня спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в подгруппах больных, различающихся по тяжести и этиологии ЦП

Примечание. Данные представлены в виде медианных значений, рассчитанных относительно среднего уровня продукции цитокинов клетками крови здоровых доноров, принятого за 100% по формуле:

(Ме цитокинов у больных ЦП / Ме цитокинов у доноров) × 100%.

ЦП класс А – подгруппа больных ЦП класса А невирусной этиологии (n = 5). ЦП В+С – подгруппа больных ЦП класса В+С вирусной этиологии (n = 5). 1 – все цитокины (n = 26); 2 – про/противовоспалительные (n = 4); 3 – Th1/Th2/Th9/Th17 (n = 10); 4 – ростовые факторы (n = 5); 5 – хемокины (n = 7).

* – p < 0,05 и ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (до начала КТ); # – p < 0,05 и ## – p < 0,01 – достоверность различия по сравнению с показателями ЦП класс А (W – непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок).

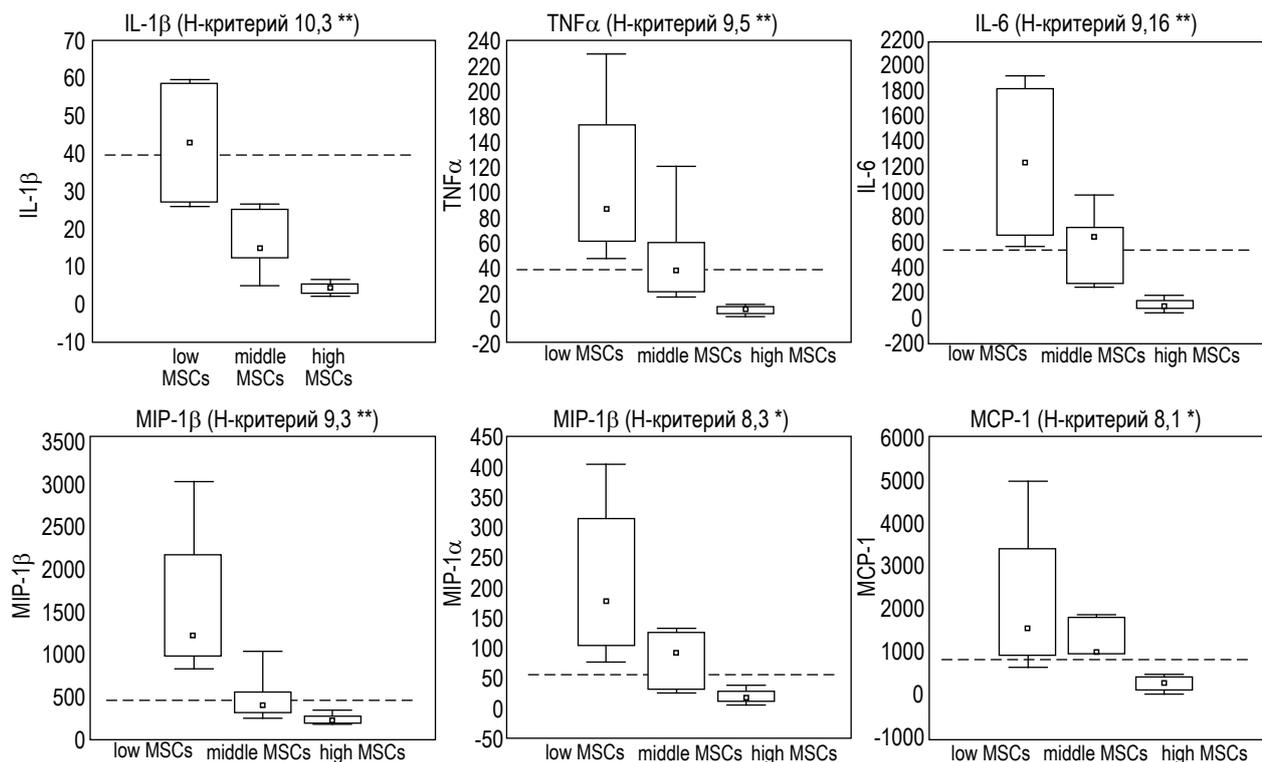


Рисунок 4. Межгрупповые различия больных ЦП по уровню спонтанной продукции цитокинов/хемокинов после завершения КТ в зависимости от дозы вводимых МСК

Примечание. Показаны различия по уровню IL-1 β , TNF α , IL-6, MCP-1, MIP-1 α , и MIP-1 β в подгруппах больных, у которых доза вводимых MSCs была < 10,3 млн клеток («low MSCs»; Me – 6,35 млн; n = 4), в интервале 10,4-27,3 млн («middle MSCs»; Me – 16,5 млн; n = 6) и > 27,4 млн («high MSCs»; Me – 40,0 млн; n = 4). Данные получены при проведении дисперсионного анализа Краскела–Уоллиса и представлены в виде медиан, интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений. Пунктирной линией показан средний уровень (Me) спонтанной продукции цитокинов/хемокинов в подгруппе здоровых доноров (n = 10).

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

МСК, исходно высокая цитокин-секреторная активность клеток крови больных ЦП как в спонтанных, так и в ЛПС-стимулированных культурах снижалась в среднем до 60-80% относительно нормального уровня.

Наиболее ярко корригирующий эффект трансплантации МСК на цитокин-секреторную функцию циркулирующих лейкоцитов проявлялся в подгруппе больных ЦП класса В+С вирусной этиологии. Из данных рисунка 3 видно, что именно эти пациенты, в отличие от больных ЦП класса А невирусной этиологии, характеризовались гиперпродукцией цитокинов различных функциональных групп как в отсутствие стимуляции, так и в ответ на эндотоксин. По завершении курса КТ интенсивность как спонтанной, так и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов в обеих подгруппах больных ЦП достоверно снижалась до 60-70% относительно нормы. Но учитывая более высокий исходный уровень секреции цитокинов у больных ЦП класса В+С ви-

русной этиологии, можно заключить, что ингибирующий эффект трансплантируемых клеток в этой группе был более выраженным.

Снижение цитокин-секреторной активности клеток крови больных ЦП в динамике проведения КТ могло быть обусловлено либо непосредственным действием трансплантированных МСК, либо отсроченным эффектом костномозговых МНК. Поэтому на следующем этапе был проведен корреляционный анализ между количеством трансплантируемых клеток (МНК и МСК) и концентрацией цитокинов в культурах клеток крови. Корреляционный анализ не выявил какой-либо значимой взаимосвязи между количеством МНК и уровнем спонтанной продукции цитокинов, определяемых как на 2-3 сутки после введения МНК (за исключением TNF α , $r_s = -0,51$; $p = 0,025$), так и по завершении курса КТ.

В то же время достаточно большой спектр цитокинов, спонтанно секретируемых клетка-

ми крови больных ЦП, обратно коррелировал с количеством трансплантированных МСК. В частности, были выявлены статистически значимые взаимосвязи дозы вводимых МСК с уровнем продукции про- и противовоспалительных цитокинов ($\text{TNF}\alpha$ $r_s = -0,81$; $p = 0,0004$; $\text{IL-1}\beta$ $r_s = -0,75$; $p = 0,002$; IL-1ra $r_s = -0,68$; $p = 0,007$; IL-10 $r_s = -0,56$; $p = 0,03$), иммунорегуляторных цитокинов (IL-6 $r_s = -0,81$; $p = 0,0004$; IL-15 $r_s = -0,79$; $p = 0,0001$), ростовых факторов (G-CSF $r_s = -0,64$; $p = 0,013$) и хемокинов (IL-8 $r_s = -0,59$; $p = 0,025$; MCP-1 $r_s = -0,73$; $p = 0,003$; $\text{MIP-1}\alpha$ $r_s = -0,74$; $p = 0,002$; $\text{MIP-1}\beta$ $r_s = -0,76$; $p = 0,001$), оцениваемых на 2-3 сутки после трансплантации МСК.

Зависимость уровня спонтанной продукции цитокинов от дозы трансплантируемых МСК четко визуализируется при проведении дисперсионного однофакторного анализа. В качестве примера на рисунке 4 представлены данные по уровню продукции $\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL-6 , MCP-1 , $\text{MIP-1}\alpha$, и $\text{MIP-1}\beta$ в подгруппах больных, у которых доза вводимых МСК была $< 10,3$ млн клеток ($\text{Me} - 6,35$ млн), в интервале $10,4-27,3$ млн ($\text{Me} - 16,5$ млн) и $> 27,4$ млн клеток ($\text{Me} - 40,0$ млн). Хорошо видно, что H -критерий Краскела–Уоллиса, отражающий межгрупповые различия по тому или иному цитокину/хемокину, варьировал от 8,1 до 10,3 и был высоко значимым ($p < 0,05$ и $< 0,01$).

Обсуждение

Провоспалительный статус у пациентов с ЦП является известным феноменом, и выраженность воспаления ассоциирована с тяжестью ЦП и развитием внепеченочных осложнений [3, 19, 34, 58]. Поскольку воспалительная реакция является триггером и поддерживает развитие фиброза, значительный интерес в лечении ЦП отводится противовоспалительным стратегиям [41]. Действительно, подавление воспаления благоприятствует регенерации печени при острой печеночной недостаточности [47, 57] и позитивно сказывается на функциях печени при тяжелых формах алкогольной болезни [7, 52].

В настоящей работе мы исследовали влияние аутологичных КМК на выраженность воспалительной реакции у больных ЦП и охарактеризовали в сравнении эффект МНК и МСК.

Клинико-лабораторный анализ в группе 20 рекрутированных пациентов показал, что проведение клеточной терапии не сопровождалось развитием побочных эффектов, и к моменту завершения лечения (в среднем через 16-17 сут. после введения МНК) у пациентов уже отмечались первые позитивные сдвиги в виде снижения транс-

аминаз и нормализации исходно сниженного количества лейкоцитов.

Оценка цитокин-секреторной активности клеток крови показала, что по сравнению с донорами больные ЦП исходно отличались повышенной продукцией ряда про-/противовоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов, хемокинов и ростовых факторов. При анализе спонтанной продукции цитокинов клетками крови 3 из 26 цитокинов (IL-9 , $\text{MIP-1}\beta$ и IP-10) были достоверно повышены, а возрастание еще 10 цитокинов ($\text{TNF}\alpha$, IL-1ra , IL-4 , IL-5 , IL-6 , IL-13 , MCP-1 , $\text{MIP-1}\alpha$, RANTES и Eotaxin) проявлялось в виде тренда. При этом клетки крови больных ЦП сохраняли чувствительность к стимулирующему действию ЛПС. Более того индуцированная эндотоксином продукция 11 из 26 цитокинов (IL-1ra , IL-6 , IL-9 , IL-15 , IL-17 , IL-7 , IL-8 , IP-10 , $\text{MIP-1}\alpha$, $\text{MIP-1}\beta$, Eotaxin) значимо превышала нормативные значения.

Полученные результаты согласуются с данными о возрастании концентрации провоспалительных и иммунорегуляторных цитокинов ($\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , IL-17), хемокинов (IL-8 , IP-10) в сыворотке крови и более активной продукции хемокинов циркулирующими моноцитами [11, 19, 25]. С другой стороны, эти результаты свидетельствуют об участии циркулирующих лейкоцитов в поддержании воспалительного статуса при ЦП и возможности использования клеток цельной крови при исследовании эффективности противовоспалительной терапии.

Трансплантация костномозговых МНК оказывала минимальное влияние на спонтанную продукцию цитокинов, которое проявлялось незначительным снижением продукции IL-4 и IL-5 . В то же время трансплантация МСК приводила к статистически достоверному снижению спонтанной продукции 20 из 26 анализируемых цитокинов, включая все 4 медиатора из группы про-/противовоспалительных цитокинов ($\text{IL-1}\beta$, $\text{TNF}\alpha$, IL-1ra , IL-10), 7 из 10 иммунорегуляторных цитокинов (IL-2 , $\text{IFN}\gamma$, IL-4 , IL-5 , IL-6 , IL-13 , IL-15), 6 из 7 хемокинов (IL-8 , IP-10 , $\text{MIP-1}\alpha$, $\text{MIP-1}\beta$, RANTES , Eotaxin) и 3 из 5 ростовых фактора (IL-7 , FGF-b , PDGF).

По сравнению с донорами у больных ЦП отмечалось значимое усиление ЛПС-стимулированной продукции IL-1ra , IL-6 , IL-9 , IL-15 , IL-17 , IL-7 , а также хемокинов: IL-8 , IP-10 , $\text{MIP-1}\alpha$, $\text{MIP-1}\beta$, Eotaxin . После введения МНК регистрировалось умеренное ослабление индуцированной продукции IL-17 и Eotaxin . Вместе с тем дополнительно усиливалась продукция G-CSF , IL-10 и VEGF , и их уровень значимо превышал таковой у доноров.

В свою очередь трансплантация МСК сопровождалась значимым снижением 18 из 26 цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (IL-1 β , TNF α , IL-1ra), иммунорегуляторные цитокины (IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (IL-7, VEGF, FGF-b) и хемокины (IP-10, MIP-1 α , Eotaxin). За исключением IL-12 (продукция которого снижалась ниже нормы), профиль цитокинов, секретируемых клетками крови больных ЦП в ответ на ЛПС, после окончания КТ достоверно не отличался от показателей здоровых доноров.

Нормализация спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитокинов после трансплантации МСК, свидетельствует об ослаблении воспалительной активности клеток крови и снижении их реактивности к эндотоксину. Супрессорный эффект МСК на цитокин-секреторную функцию клеток может опосредоваться через различные паракринные механизмы, поскольку хорошо известно, что МСК активно продуцируют широкий спектр иммуносупрессорных медиаторов (IDO, PGE2, TGF- β , HGF, TSG-6, HLA-G, galectin-3 и др.) [15, 28, 31, 48]. ЛПС и активация его рецептора TLR4 имеют прямое отношение к развитию фиброза, поскольку в условиях повышенной проницаемости кишечной стенки эндотоксин попадает в циркуляцию и может активировать клетки крови к продукции провоспалительных цитокинов и хемокинов, а также подавлять экспрессию ингибиторного TGF- β 1 псевдореператора, что приводит к активации фиброгенной активности звездчатых клеток/миофибробластов [8, 56]. Поэтому снижение реактивности клеток крови к ЛПС может ограничивать их профиброгенную активность.

Сравнивая иммуномодулирующие эффекты МНК и МСК можно заключить, что они существенно различались. Действие МНК проявлялось умеренным снижением исходно повышенной спонтанной продукции про- и противовоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1ra), хемокинов (MIP-1 α , RANTES), а также Th2-цитокинов (IL-4, IL-5, IL-6, IL-13), обладающих профиброгенной активностью [20, 36, 40, 55]. Эффект МНК в отношении ЛПС-стимулированной продукции цитокинов проявлялся умеренным ослаблением синтеза IL-17 и Eotaxin, уровень которых уже не отличался от нормативного, а также значимым усилением продукции IL-10, G-CSF и VEGF, обладающих, по данным литературы, иммуносупрессорной активностью [14, 18, 30].

В то же время МСК оказывали четкое иммуносупрессивное влияние в отношении спонтанной и ЛПС-индуцированной продукции цитоки-

нов как на уровне отдельных медиаторов, так и сформированных функциональных семейств/групп цитокинов (табл. 1-3). Характерно, что, несмотря на однонаправленное (ингибирующее) действие МСК на цитокин-секреторную функцию клеток крови, их эффект включал элемент иммуномодуляции. Так, супрессивный эффект МСК на продукцию цитокинов наиболее ярко проявлялся у пациентов с декомпенсированным ЦП вирусной этиологии, которые исходно отличались гиперпродукцией цитокинов, тогда как в оппозитной группе больных ЦП класса А невирусной этиологии ингибирующий эффект МСК был менее выраженным.

Поскольку введению МСК предшествовала трансплантация костномозговых МНК, нельзя было исключить, что наблюдаемая по завершении курса КТ нормализация цитокинового профиля связана с отсроченным влиянием МНК. Однако корреляционный анализ выявил наличие обратных взаимосвязей между количеством введенных МСК и уровнем продукции TNF α , IL-1 β , IL-1ra, IL-10, IL-6, IL-15, G-CSF, IL-8, MCP-1, MIP-1 α и MIP-1 β . В то же время доза МНК не коррелировала с продукцией цитокинов, определяемых как на 2-3 сутки после введения МНК (за исключением TNF α , $r_s = -0,51$; $p = 0,025$), так и по завершении курса КТ. Таким образом, выраженный иммунорегуляторный эффект КТ, проявляющийся в нормализации цитокинового профиля, был обусловлен, прежде всего, действием МСК.

Экспериментальные исследования в модели фиброза печени свидетельствуют, что улучшение функции печени после трансплантации МСК сопряжено с подавлением воспалительной реакции и фиброгенеза [6, 16, 26, 53]. При этом эффект внутривенного введения МСК проявляется снижением экспрессии провоспалительных и профиброгенных цитокинов (мРНК IL-1 β , IL-6, TNF α и TGF- β) и возрастанием сывороточного уровня IL-10 [60]. Тем не менее в тех же экспериментальных моделях ряд других авторов не обнаружили указанных эффектов МСК [13, 39]. Относительно сведений о противовоспалительном эффекте КМК у больных ЦП, такие данные полностью отсутствуют. С этой точки зрения нами впервые показано, что последовательное введение аутологичных костномозговых МНК и МСК больным ЦП нормализует цитокиновый профиль за счет снижения гиперпродукции цитокинов из различных функциональных групп.

Полученные нами данные отчасти согласуются с результатами Zhao W. с соавт. [60], однако в отличие от этих авторов мы выявили снижение исходно повышенной продукции как про-,

так и противовоспалительных цитокинов. Выявленные различия, очевидно, связаны с использованием авторами иного типа МСК (частично дифференцированных в гепатоцитарном направлении), с оценкой уровня только одного IL-10 в сыворотке крови (другие цитокины определялись по экспрессии генов с помощью RT-PCR), а также с патогенетическими особенностями фиброгенеза в модели CCL4-индуцированного поражения печени у животных (крыс) и ЦП у человека.

Определенными ограничениями наших исследований является, то, что исследуемая груп-

па была представлена относительно небольшим числом пациентов (n = 20). В работе не была исследована продолжительность иммуномодулирующего эффекта КТ. Кроме того, представлялось интересным проанализировать, сказываются ли изменения продукции цитокинов клетками крови на фиброгенной активности сыворотки крови. Дальнейшие проспективные исследования позволят ответить на ряд из этих вопросов, а также более полно (через 12-24 мес. наблюдения) оценить клиническую значимость аутологичной трансплантации костномозговых МНК и МСК в лечении больных ЦП.

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. Черных Е.Р., Пальцев А.И., Старостина Н.М., Останин А.А., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Меледина И.В., Селихова Ю.Б., Демидчик С.Н., Никонов С.Д., Кожевников В.С., Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Козлов В.А. Аутологичные клетки костного мозга в комплексном лечении пациентов с хроническими гепатитами и циррозом печени // Гепатология, 2005. № 1 С. 30-36. [Chernykh E.R., Paltzev A.I., Starostina N.M., Ostanin A.A., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Meledina I.V., Selihova Yu.B., Demidchik S.N., Nikonov S.D., Kozevnikov V.S., Kulagin A.D., Lisukov I.A., Kozlov V.A. Autologous bone marrow cells in complex treatment of chronic hepatitis and cirrhosis. *Gepatologiya = Hepatology*, 2005, no. 1, pp. 30-36. (In Russ.)]
3. Черных Е.Р., Старостина Н.М., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Агапитова С.В., Шипунов М.В., Останин А.А., Козлов В.А. Цитокиновый профиль у больных хроническими вирусными гепатитами с фиброзом и циррозом печени // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 4. С. 539-546. [Chernykh E.R., Starostina N.M., Leplina O.Yu., Shevela E.Yu., Agapitova S.V., Shipunov M.V., Ostanin A.A., Kozlov V.A. Cytokine profile in patients with chronic virus hepatitis complicated with fibrosis and cirrhosis. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 539-546. doi: 10.15789/1563-0625-2006-4-539-546 (In Russ.)]
4. Черных Е.Р., Старостина Н.М., Пальцев А.И., Леплина О.Ю., Шевела Е.Я., Шипунов М.В., Селихова Ю.Б., Кулагин А.Д., Лисуков И.А., Никонов С.Д., Останин А.А., Козлов В.А. Лечение цирроза печени с использованием трансплантации аутологичных клеток костного мозга // Клеточные технологии. Теоретические и прикладные аспекты / Под ред. Козлова В.А., Сенникова С.В., Черных Е.Р., Останина А.А. Новосибирск: Наука, 2009. С. 171-188. [Chernykh E.R., Starostina N.M., Paltzev A.I., Leplina O.Yu., Shevela E.Ya., Shipunov M.V., Selihova Yu.B., Kulagin A.D., Lisukov I.A., Nikonov S.D., Ostanin A.A., Kozlov V.A. Treatment of liver cirrhosis using autologous bone marrow cell transplantation [Cell technologies. Theoretical and applied aspects. Edited by Kozlov V.A., Sennikov S.V., Chernykh E.R., Ostanin A.A.]. Novosibirsk: Nauka, 2009, pp. 171-188.
5. Шевела Е.Я., Старостина Н.М., Пальцев А.И., Шипунов М.В., Желтова О.И., Меледина И.В., Хван Л.А., Леплина О.Ю., Останин А.А., Черных Е.Р., Козлов В.А. Эффективность клеточной терапии при циррозе печени // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2015 (в печати). [Shevela E.Ya., Starostina N.M., Paltzev A.I., Shipunov M.V., Zheltova O.I., Meledina I.V., Hvan L.A., Leplina O.Yu., Ostanin A.A., Chernykh E.R., Kozlov V.A. The efficiency of cell therapy in liver cirrhosis. *Kletochnye tekhnologii v biologii i meditsine = Cell Technologies in Biology and Medicine*, 2015 (in press). (In Russ.)]
6. Abdel Aziz M.T., Atta H.M., Mahfouz S., Fouad H.H., Roshdy N.K., Ahmed H.H., Rashed L.A., Sabry D., Hassouna A.A., Hasan N.M. Therapeutic potential of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on experimental liver fibrosis. *Clin. Biochem.*, 2007, Vol. 40, no. 12, pp. 893-899.
7. 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. *Gastroenterology*, 2000, Vol. 119, no. 6, pp. 1637-1648.
8. Aoyama T., Paik Y.H., Seki E. Toll-like receptor signaling and liver fibrosis. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2010, Vol. 2010, article ID 192543, 8 p.
9. Bai Y.Q., Yang Y.X., Yang Y.G., Ding S.Z., Jin F.L., Cao M.B., Zhang Y.R., Zhang B.Y. Outcomes of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in decompensated liver cirrhosis. *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 26, pp. 8660-8666.

10. Burunova V.V., Suzdaltseva Y.G., Voronov A.V., Cheglakov I.B., Vakhrushev I.V., Yarygin K.N., Yarygin V.N. Development and introduction of production standards for cell products of mesenchymal origin. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2008, Vol. 145, no. 4, pp. 526-530.
11. 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.
12. 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.
13. Carvalho A.B., Quintanilha L.F., Dias J.V., Paredes B.D., Mannheimer E.G., Carvalho F.G., Asensi K.D., Gutfilem B., Fonseca L.M.B., Resende C.M.C., Rezende G.F.M., Takiya C.M., de Carvalho A.C.C., Goldenberg R.C. S. Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells do not reduce fibrosis or improve function in a rat model of severe chronic liver injury. *Stem Cells*, 2008, Vol. 26, no. 5, pp. 1307-1314.
14. de Waal Malefyt R., Abrams J., Bennett B., Figdor C.G., de Vries J.E. Interleukin 10 inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J. Exp. Med.*, 1991, Vol. 174, no. 5, pp. 1209-1220.
15. Doorn J., Moll G., Le Blanc K., van Blitterswijk C., de Boer J. Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells: paracrine effects and potential improvements. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 2012, Vol. 18, no. 2, pp. 101-115.
16. Fang B., Shi M., Liao L., Yang S., Liu Y., Zhao R.C. Systemic infusion of FLK1(+) mesenchymal stem cells ameliorate carbon tetrachloride-induced liver fibrosis in mice. *Transplantation*, 2004, Vol. 78, no. 1, pp. 83-88.
17. Forbes S.J., Newsome P.N. New horizons for stem cell therapy in liver disease. *J. Hepatol.*, 2012, Vol. 56, no. 2, pp. 496-499.
18. Gavalas N.G., Tsiatas M., Tsitsilonis O., Politi E., Ioannou K., Ziogas A.C., Rodolakis A., Vlahos G., Thomakos N., Haidopoulos D., Terpos E., Antsaklis A., Dimopoulos M.A., Bamias A. VEGF directly suppresses activation of T cells from ascites secondary to ovarian cancer via VEGF receptor type 2. *British J. Cancer.*, 2012, Vol. 107, pp. 1869-1875.
19. 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, pp. 943-948.
20. Huaux F., Liu T., McGarry B., Ullenbruch M., Phan S.H. Dual roles of IL-4 in lung injury and fibrosis. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 4, pp. 2083-2092.
21. Khan A.A., Parveen N., Mahaboob V.S., Rajendraprasad A., Ravindrakrishna H.R., Venkateswarlu J. Safety and efficacy of autologous bone marrow stem cell transplantation through hepatic artery for the treatment of chronic liver failure: a preliminary study. *Transplant Proc.*, 2008, Vol. 40, no. 4, pp. 1140-1144.
22. Kharazimi P., Hellstrom P.M., Noorinayer B., Farzaneh F., Aghajani K., Jafari F., Telkabadi M., Atashi A., Honardoost M., Zali M.R., Soleimani M. Improvement of liver function in liver cirrhosis patients after autologous mesenchymal stem cell injection: a phase I-II clinical trial. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, Vol. 21, pp. 1199-1205.
23. Kim J.K., Park Y.N., Kim J.S., Park M.S., Paik Y.H., Seok J.Y., Chung Y.E., Kim H.O., Kim K.S., Ahn S.H., Kim do Y., Kim M.J., Lee K.S., Chon C.Y., Kim S.J., Terai S., Sakaida I., Han K.H. Autologous bone marrow infusion activates the progenitor cell compartment in patients with advanced liver cirrhosis. *Cell Transplant.*, 2010, Vol. 19, pp. 1237-1246.
24. Kisseleva T., Cong M., Paik Y., Scholten D., Jiang C., Benner C., Iwaisako K., Moore-Morris T., Scott B., Tsukamoto H., Evans S.M., Dillmann W., Glass C.K., Brenner D.A. Myofibroblasts revert to an inactive phenotype during regression of liver fibrosis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 2012, Vol. 109, no. 24, pp. 9448-9453.
25. 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.
26. Lee M.J., Jung J., Na K-H., Moon J.S., Lee H-J., Kim J-H., Kim G., Kwon S-W., Hwang S-G., Kim G.J. Anti-fibrotic effect of chorionic platederived mesenchymal stem cells isolated from human placenta in a rat model of CCl(4)-injured liver: potential application to the treatment of hepatic diseases. *J. Cell. Biochem.*, 2010, Vol. 111, no. 6, pp. 1453-1463.
27. Liang X., Ding D., Zhang Y., Tse H-F, Lian Q. Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplantation.*, 2014, Vol. 23, no. 9, pp. 1045-1059.
28. Liu Y., Zhang R., Yan K., Chen F., Huang W., Lv B., Sun C., Xu L., Li F., Jiang X. Mesenchymal stem cells inhibit lipopolysaccharide-induced inflammatory responses of BV2 microglial cells through TSG-6. *J. Neuroinflammation*, 2014, Vol. 11, article 135.
29. Lyra A.C., Soares M.B., da Silva L.F., Fortes M.F., Silva A.G., Mota A.C., Oliveira S.A., Braga E.L., de Carvalho W.A., Genser B., dos Santos R.R., Lyra L.G. Feasibility and safety of autologous bone marrow mononuclear cell transplantation in patients with advanced chronic liver disease. *World J. Gastroenterol.*, 2007, Vol. 13, pp. 1067-1073.

30. Martins A., Jiahuai Han J., Kim S.O. The multifaceted effects of granulocyte colony-stimulating factor in immunomodulation and potential roles in intestinal immune homeostasis. *IUBMB Life*, 2010, Vol. 62, no. 8, pp. 611-617.
31. Maumus M., Jorgensen C., Noel D. Mesenchymal stem cells in regenerative medicine applied to rheumatic diseases: Role of secretome and exosomes. *Biochimie*, 2013, Vol. 95, pp. 2229-2234.
32. Meier R.P.H., Muller Y.D., Morel P., Gonelle-Gispert C., Buhler L.H. Transplantation of mesenchymal stem cells for the treatment of liver diseases, is there enough evidence? *Stem. Cell Research*, 2013, Vol. 11, no. 3, pp. 1348-1364.
33. Mohamadnejad M., Namiri M., Bagheri M., Hashemi S.M., Ghanaati H., Zare Mehrjardi N., Kazemi Ashtiani S., Malekzadeh R., Baharvand H. Phase 1 human trial of autologous bone marrow-hematopoietic stem cell transplantation in patients with decompensated cirrhosis. *World J. Gastroenterol.*, 2007, Vol. 13, pp. 3359-3363.
34. Neuman M.G. Cytokines – central factors in alcoholic liver disease. *Alcohol Research and Health*, 2003, Vol. 27, no. 4, pp. 307-316.
35. Okumoto K., Saito T., Haga H., Hattori E., Ishii R., Karasawa T., Suzuki A., Misawa K., Sanjo M., Ito J.I., Sugahara K., Saito K., Togashi H., Kawata S. Characteristics of rat bone marrow cells differentiated into a liver cell lineage and dynamics of the transplanted cells in the injured liver. *J. Gastroenterol.*, 2006, Vol. 41, pp. 62-69.
36. O'Reilly S., Hogle T., Griffiths B., Krippner A., van Laar J.M. T cell derived IL-6 and IL-13 drive fibroblast fibrosis: implications for systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2012, Vol. 71, Suppl. 1, A46-A47.
37. Parekkadan B., van Poll D., Megeed Z., Kobayashi N., Tilles A.W., Immunomodulation of activated hepatic stellate cells by mesenchymal stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2007, Vol. 363, pp. 247-252.
38. Peng L., Xie D.Y., Lin B.L., Liu J., Zhu H.P., Xie C., Zheng Y.B., Gao Z.L. Autologous bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in liver failure patients caused by hepatitis B: short-term and long-term outcomes. *Hepatology*, 2011, Vol. 54, pp. 820-828.
39. Popp F.C., Slowik P., Eggenhofer E., Renner P., Lang S.A., Stoeltzing O., Geissler E.K., Piso P., Schlitt H.J., Dahlke M.H. No contribution of multipotent mesenchymal stromal cells to liver regeneration in a rat model of prolonged hepatic injury. *Stem. Cells*, 2007, Vol. 25, no. 3, pp. 639-645.
40. Reiman R.M., Thompson R.W., Feng C.G., Hari D., Knight R., Cheever A.W., Rosenberg H.F., Wynn T.A. Interleukin-5 (IL-5) augments the progression of liver fibrosis by regulating IL-13 activity. *Infect. Immun.*, 2006, Vol. 74, no. 3, pp. 1471-1479.
41. Rosenbloom J., Mendoza F.A., Jimenez S.A., Strategies for anti-fibrotic therapies. *Biochimica et Biophysica Acta: Molecular Basis of Disease*, 2013, Vol. 1832, no. 7, pp. 1088-1103.
42. Saito T., Okumoto K., Haga H., Nishise Y., Ishii R., Sato C., Watanabe H., Okada A., Ikeda M., Togashi H., Ishikawa T., Terai S., Sakaida I., Kawata S. Potential therapeutic application of intravenous autologous bone marrow infusion in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Stem. Cells Dev.*, 2011, Vol. 20, pp. 1503-1510.
43. Saito T., Tomita K., Haga H., Okumoto K., Ueno Y. Bone marrow cell-based regenerative therapy for liver cirrhosis. *World J. Methodol.*, 2013, Vol. 3, no. 4, pp. 65-69.
44. Sakaida I., Terai S., Yamamoto N., Aoyama K., Ishikawa T., Nishina H., Okita K. Transplantation of bone marrow cells reduces CCl4-induced liver fibrosis in mice. *Hepatology*, 2004, Vol. 40, pp. 1304-1311.
45. Schuppan D., Kim Y.O. Evolving therapies for liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 5, pp. 1887-1901.
46. Schwartz R.E., Reyes M., Koodie L., Jiang Y., Blackstad M., Lund T., Lenvik T., Johnson S., Hu W.S., Verfaillie C.M. Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 109, pp. 1291-1302.
47. Sgroi A., Gonelle-Gispert C., Morel P., Baertschiger R.M., Niclauss N., Mentha G., Majno P., Serre-Beinier V., Buhle L. Interleukin-1 receptor antagonist modulates the early phase of liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 9, e25442.
48. Sioud M., Mobergslien A., Boudabous A., Floisand Y. Mesenchymal stem cell-mediated T cell suppression occurs through secreted galectins. *Int. J. Oncology*, 2011, Vol. 38, no. 2, pp. 385-390.
49. Takami T., Terai S., Sakaida I. Stem cell therapy in chronic liver disease. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 28, pp. 203-208.
50. Terai S., Ishikawa T., Omori K., Aoyama K., Marumoto Y., Urata Y., Yokoyama Y., Uchida K., Yamasaki T., Fujii Y., Okita K., Sakaida I. Improved liver function in patients with liver cirrhosis after autologous bone marrow cell infusion therapy. *Stem. Cells*, 2006, Vol. 24, pp. 2292-2298.
51. Terai S., Sakaida I., Yamamoto N., Omori K., Watanabe T., Ohata S., Katada T., Miyamoto K., Shinoda K., Nishina H., Okita K. An *in vivo* model for monitoring trans-differentiation of bone marrow cells into functional hepatocytes. *J. Biochem.*, 2003, Vol. 134, pp. 551-558.
52. 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-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. *J. Hepatol.*, 2003, Vol. 38, no. 4, pp. 419-425.

53. Tsai P.-C., Fu T.-W., Chen Y.-M.A., Ko T.-L., Chen T.-H., Shih Y.-H., Hung S.-C., Fu Y.-S. The therapeutic potential of human umbilical mesenchymal stem cells from Wharton's jelly in the treatment of rat liver fibrosis. *Liver Transpl.*, 2009, Vol. 15, no. 5, pp. 484-495.
54. Usunier B., Benderitter M., Tamarat R., Chapel A. Management of fibrosis: the mesenchymal stromal cells breakthrough. *Stem. Cells International*, 2014, Vol. 2014, Article ID 340257, 26 p.
55. Weng S.-Y., Wang X.-Y., Tang Y., Kim Y.O., Molokanova O., Brombacher F., Boop T., Schild H.-J., Waisman A., Schuppan D. IL-4/IL-13 exacerbate liver fibrosis progression through alternatively activated macrophages. *J. Hepatol.*, 2015, Vol. 62, Suppl. 2, p. S474.
56. Yang L, Seki E. Toll-like receptors in liver fibrosis: cellular crosstalk and mechanisms. *Front Physiol.*, 2012, Vol. 3, article 138, 18 p.
57. Yang Z.F., Ho D.W.Y., Ngai P., Lau C.K., Zhao Y., Poon R.T.P., Fan S.T. Antiinflammatory properties of IL-10 rescue small-for-size liver grafts. *Liver Transpl.*, 2007, Vol. 13, no. 4, pp. 558-565.
58. Zampino R., Marrone A., Restivo L., Guerrero 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.
59. Zhang Z., Lin H., Shi M., Xu R., Fu J., Lv J., Chen L., Lv S., Li Y., Yu S., Geng H., Jin L., Lau G.K.K., Wang F-S. Human umbilical cord mesenchymal stem cells improve liver function and ascites in decompensated liver cirrhosis patients. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2012, Vol. 27 (Suppl. 2), pp. 112-120.
60. Zhao W., Li J.J., Cao D.Y., Li X., Zhang L.Y., He Y., Yue S.Q., Wang D.S., Dou K.F. Intravenous injection of mesenchymal stem cells is effective in treating liver fibrosis. *World J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 18, no. 10, pp. 1048-1058.

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 04.09.2015
Принята к печати 29.09.2015

Received 04.09.2015
Accepted 29.09.2015

КЛЕТОЧНАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ИНТЕРФЕРОНУ- α 2 *IN VITRO* У ДЕТЕЙ С ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ, ВЫЗВАННЫМ ВИРУСОМ ЭПШТЕЙНА-БАРР

Куртасова Л.М.¹, Шакина Н.А.², Шмидт А.Р.²

¹ ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

² КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Красноярск, Россия

Резюме. Цель исследования – изучение клеточной чувствительности лейкоцитов крови *in vitro* к интерферону- α 2 у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр в острый период заболевания.

Обследованы 65 детей в возрасте 4-6 лет в острый период инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ). Контрольную группу составили 36 практически здоровых детей. Клеточную чувствительность лейкоцитов крови к интерферону- α 2 *in vitro* определяли способом Л.М. Куртасовой с соавт. (2007). Хемилюминесценцию лейкоцитов крови изучали методом De Sole et al. (1983).

У детей с ВЭБ-инфекцией в острый период заболевания отмечается уменьшение диапазона клеточной чувствительности лейкоцитов крови к интерферону- α 2 и наблюдается зависимость клеточной чувствительности от дозы препарата и тяжести заболевания.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости индивидуального подхода к интерферонотерапии у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр.

Ключевые слова: клеточная чувствительность, лейкоциты крови, интерферон, вирус Эпштейна-Барр

***IN VITRO* CELLULAR RESPONSE TO INTERFERON- α 2 IN CHILDREN WITH INFECTIOUS MONONUCLEOSIS CAUSED BY EPSTEIN-BARR VIRUS**

Kurtasova L.M.^a, Shakina N.A.^b, Schmidt A.R.^b

^a Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

^b Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Our objective was to study *in vitro* response of blood leukocytes to IFN α 2 in children with infectious mononucleosis, caused by the Epstein-Barr virus, during the acute phase of disease. Patients and methods. Sixty-five children at the age of 4 to 6 years, being in acute phase of infectious mononucleosis caused by the Epstein-Barr virus (EBV) were under study. The control group consisted of 36 healthy children. *In vitro*

Адрес для переписки:

Куртасова Людмила Михайловна
ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого»
Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 220-06-28.
Факс: 8 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Address for correspondence:

Kurtasova Lyudmila M.
Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zhelesnyak str., 1.
Phone: 7 (391) 220-06-28.
Fax: 7 (391) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozenie@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.М. Куртасова, Н.А. Шакина, А.Р. Шмидт,
«Клеточная чувствительность к интерферону- α 2
in vitro у детей с инфекционным мононуклеозом,
вызванным вирусом Эпштейна-Барр» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 79-84.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-79-84

© Куртасова Л.М. и соавт., 2016

For citation:

L.M. Kurtasova, N.A. Shakina, A.R. Schmidt, “*In vitro*
cellular response to interferon- α 2 in children with infectious
mononucleosis caused by Epstein-Barr virus”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 1, pp. 79-84.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-79-84

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-79-84>

response of blood leukocytes to $IFN\alpha 2$ was determined by the original technique (L.M. Kurtasova et al., 2007). Chemiluminescence of the blood leukocytes was studied according to De Sole et al. (1989). Results. We observed that clinical condition of the children with EBV infection in acute phase of the disease was characterized by decreased ranges of blood leukocyte response to $IFN\alpha 2$, and dependence of the cellular response on the dose, as well as severity of the disease. In conclusion, these data suggest a need for individual strategy of interferon therapy for the children with infectious mononucleosis caused by the Epstein-Barr virus.

Keywords: cell response, blood leukocytes, interferon, Epstein-Barr virus

Введение

В настоящее время инфекционный мононуклеоз, вызванный вирусом Эпштейна-Барр (ВЭБ), рассматривается как заболевание иммунной системы. Активная пролиферация вируса во всех органах, имеющих лимфоидную ткань, приводит к структурным изменениям, затрагивающим все звенья иммунной системы [3, 6, 7, 8].

На сегодняшний день проблема иммунокоррекции при инфекционном мононуклеозе у детей по-прежнему остается одной из самых сложных, не достаточно изученных и важных. В то же время применение интерферонов (IFN) открыло новую эру в терапии вирусных инфекций у детей.

Известно, что IFN, кроме противовирусного и антипролиферативного действия, обладают ярко выраженными иммуномодулирующими свойствами: повышают активность NK-клеток, процессы фагоцитоза и цитотоксичность нейтрофильных гранулоцитов. Также влияют на экспрессию мембранных рецепторов, изменяя топографию мембраны, воздействуя на продукцию и секрецию внутриклеточных белков и активность ферментных систем, в частности запускают ферментативные реакции окисления с образованием активных форм кислорода. В целом под действием IFN развивается целый каскад реакций, проявляющихся на клеточном, системном и организменном уровне [1, 2].

Между тем до сих пор не разработаны терапевтические подходы к интерферонотерапии у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, с учетом варианта течения и тяжести заболевания, а также индивидуальной чувствительности больного к интерфероновым препаратам.

В связи с чем **целью настоящего исследования** явилось изучение клеточной чувствительности лейкоцитов крови *in vitro* к интерферону- $\alpha 2$ у детей с инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр в острый период заболевания.

Материалы и методы

Обследованы 65 больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, в возрасте 4-6 лет со средней степенью тяжести (47 чел.) и тяжелой формой (18 чел.) заболевания в острую фазу (2-5-й день болезни). Контрольную группу составили 36 практически

здоровых детей аналогичного возрастного диапазона.

Диагноз инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна-Барр, верифицировали методом ПЦР с применением набора реагентов для выявления ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови фирмы «ДНК-технологии» (Москва) и методом ИФА с использованием тест-систем фирмы «Human» (Германия) определяли IgM VCA, IgG EA-D, IgG EBNA-1 в сыворотке крови. Все больные дети имели положительный результат на ДНК ВЭБ в лимфоцитах крови и серологические маркеры острой ВЭБ-инфекции (ВЭБ – VCA IgM, ВЭБ – EA-D IgG).

Индивидуальную клеточную чувствительность к реаферону (интерферон- $\alpha 2$) *in vitro* определяли способом Л.М. Куртасовой с соавт. [4], исследуя хемилуминесцентный ответ (ХЛ) лейкоцитов крови без воздействия реаферона и при наличии разных доз препарата в реакционной среде. ХЛ-анализ проводили по методу De Sole et al. [5].

Оценку люминолзависимой хемилуминесценции лейкоцитов крови проводили на хемилуминесцентном анализаторе «CL 3604» (Россия) в течение 90 мин. Определяли следующие показатели: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение (I_{max}) и площадь (S) под хемилуминесцентной кривой. В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл («Sigma», США). Усиление хемилуминесценции, индуцированной зимозаном, относительно спонтанной хемилуминесценции оценивали соотношением $S_{zim.}/S_{спон.}$ и определяли как индекс активации (ИА).

Концентрация реаферона в пробах рассчитывалась исходя из среднего количества лейкоцитов в периферической крови ребенка 4-6 лет, количества клеток в пробе и лечебных доз реаферона. Дозы реаферона для расчетов составили 500 тыс. МЕ, 1 млн МЕ и 1,5 млн МЕ.

Реакционная смесь в контрольной пробе содержала 200 мкл лейкоцитарной взвеси, 20 мкл донорской сыворотки, 240 мкл раствора Хенкса и 50 мкл люминола.

Опытная проба № 1 содержала 200 мкл лейкоцитарной взвеси, 20 мкл донорской сыворотки, 230 мкл раствора Хенкса, 10 мкл реаферона и 50 мкл люминола.

Опытная проба № 2 содержала 200 мкл лейкоцитарной взвеси, 20 мкл донорской сыворотки, 220 мкл раствора Хенкса, 20 мкл реаферона и 50 мкл люминола.

Опытная проба № 3 содержала 200 мкл лейкоцитарной взвеси, 20 мкл донорской сыворотки, 210 мкл раствора Хенкса, 30 мкл реаферона и 50 мкл люминола.

Статистический анализ результатов исследования проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica v. 6.0 (Stat Soft, Ins., США).

Описание количественных признаков выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (Q_{25} и Q_{75}).

Статистическую значимость различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому U-критерию Манна–Уитни. Статистическую значимость различий между показателями зависимых выборок оценивали по непараметрическому T-критерию Вилкоксона. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для того чтобы объективно оценить чувствительность лейкоцитов крови к реаферону у больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, предварительно необходимо охарактеризовать клеточный ответ на воздействие реаферона в группе здоровых детей. Результаты исследования хемилюминесцентного ответа лейкоцитов крови в группе здоровых детей на воздействие различных доз реаферона *in vitro* представлены в таблице 1.

Полученные данные свидетельствуют, что в группе здоровых детей исследуемая доза реаферона – 0,5 млн МЕ – статистически значимо не изменяет регистрируемые в ходе хемилюминесцентного анализа параметры.

В то же время воздействие реаферона в дозах 1,0 млн МЕ и 1,5 млн МЕ на кинетику спонтанного хемилюминесцентного ответа, а также уровень интенсивности и площадь спонтанной кривой хемилюминесценции лейкоцитов крови в группе здоровых детей выражается в тенденции к снижению этих параметров относительно контрольного уровня (без присутствия реаферона в реакционной среде).

Следует отметить, что различные дозы реаферона оказывали влияние на разные показатели хемилюминесцентного ответа лейкоцитов крови. Так, выраженная тенденция к ускорению времени достижения максимума интенсивности спонтанного хемилюминесцентного ответа лейкоцитов крови в группе здоровых детей наблюдается при воздействии реаферона в дозе 1,0 млн МЕ относительно контроля и соответствующего параметра при воздействии реаферона в дозе 0,5 млн МЕ. При этом воздействие реаферона в дозе 1,5 млн МЕ вызывает выраженную тенденцию к понижению максимума «дыхательной вспышки» и уменьшению площади под хемилюминесцентной кривой относительно контрольных показателей.

Анализ параметров индуцированной опсонизированным зимозаном хемилюминесценции

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНТЕРФЕРОНА- $\alpha 2$ IN VITRO У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ (Me; Q_{25} - Q_{75})

Показатели	Контроль (n = 36) 1	0,5 млн МЕ (n = 36) 2	1,0 млн МЕ (n = 36) 3	1,5 млн МЕ (n = 36) 4
Спонтанная хемилюминесценция				
T_{max} (сек.)	973,5 343,5-1777	973 325,5-1666	841,5 253,5-1519,5 0,1 > $p_{1,2}$ > 0,05	845 518-1650
I_{max} (о.е. *10 ³)	6,44 2,87-9,67	4,96 2,98-8,51	4,70 2,14-8,30	3,44 2,41-11,28 0,1 > p_1 > 0,05
S_1 (о.е. *10 ⁵)	1,40 0,78-3,05	1,16 0,61-2,60	1,08 0,61-2,66	0,98 0,64-3,08 0,1 > p_1 > 0,05
Индуцированная хемилюминесценция				
T_{max} (сек.)	1403 1030,5-1815	1459 1288,5-1962,5	1404 1060-2133	1379,5 1186-1955,5
I_{max} (о.е. *10 ³)	18,07 11,76-24,21	16,64 10,24-25,76	15,64 8,25-31,52	15,69 9,80-23,19 0,1 > p_1 > 0,05
S_2 (о.е. *10 ⁵)	3,34 2,53-5,58	3,31 1,85-6,35	3,11 1,74-7,84	3,11 1,78-5,30 $p_1 < 0,05$
Индекс активации				
S_2 / S_1	2,22 1,18-5,29	2,94 1,18-5,29	2,46 1,32-7,99	2,73 1,53-6,19

показал, что при дополнительной функциональной нагрузке лейкоциты крови в группе здоровых детей проявляют чувствительность к реаферону только в дозе 1,5 млн МЕ. Воздействие реаферона в дозе 1,5 млн МЕ на стимулированные опсонизированным зимозаном лейкоциты крови приводит к выраженной тенденции понижения максимального уровня хемилюминесцентного ответа и статистически значимому уменьшению площади под хемилюминесцентной кривой по сравнению с контрольными показателями. Необходимо отметить, что в группе здоровых детей не наблюдалось влияния реаферона на показатели индекса активации, отражающего компенсаторные возможности лейкоцитов крови.

Таким образом, можно констатировать, что лейкоциты крови у здоровых детей реагируют на воздействие реаферона *in vitro* изменением кинетики спонтанного хемилюминесцентного ответа и снижением уровня продукции активных форм кислорода в дозах 1,0 млн МЕ и 1,5 млн МЕ и не изменяют регистрируемых нами параметров при воздействии минимальной из исследуемых доз реаферона – 0,5 млн МЕ.

В условиях активации при зимозан-стимулированной хемилюминесцентной реакции изменения наблюдаются при воздействии только максимальной из исследуемых доз реаферона – 1,5 млн МЕ и затрагивают интенсивность свечения и площадь под хемилюминесцентной кривой, которая отражает суммарное количество высокоэнергетических оксидантов, продуцированное клетками за время анализа.

Также следует отметить, что статистически значимого влияния на компенсаторные возможности лейкоцитов крови, а именно изменения такого параметра хемилюминесцентного анализа как индекс активации ни одна из исследуемых доз реаферона не оказывала. Вероятно, излишняя активация выработки высокоэнергетических оксидантов может оказать повреждающее действие на лейкоциты, а также возможно истощение их функционально-метаболических возможностей. В связи с чем можно предположить, что у здоровых детей модулирующее действие реаферона выражается метаболическими изменениями в «интересах» клетки.

Результаты изучения показателей хемилюминесцентного ответа лейкоцитов крови в группе больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр средней степени тяжести, в острый период заболевания на воздействие различных доз реаферона *in vitro* представлены в таблице 2.

Проведенный анализ выявил, что реаферон *in vitro* в дозах 1,0 млн МЕ и 1,5 млн МЕ не изменяет исследуемые нами параметры хемилюминесцен-

ции лейкоцитов крови в группе больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр средней степени тяжести, в отличие от группы здоровых детей. В то же время, если лейкоциты крови у здоровых детей не реагировали изменением параметров хемилюминесценции на воздействие реаферона в дозе 0,5 млн МЕ, то в группе больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр средней степени тяжести, отмечалась выраженная тенденция к снижению интенсивности свечения и повышению индекса активации относительно контрольных показателей.

В таблице 3 представлены данные показателей хемилюминесценции лейкоцитов крови у больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, с тяжелой формой заболевания в острый период болезни. Из приведенных данных следует, что у больных детей с тяжелой формой инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна-Барр, лейкоциты крови *in vitro* реагируют изменением хемилюминесцентного ответа только на присутствие в реакционной среде реаферона в максимальной из исследуемой нами концентрации – 30 мкл реаферона, что соответствует лечебной дозе – 1,5 млн МЕ.

Под действием реаферона в 2,25 раза ($0,1 > p > 0,05$) замедляется время выхода на максимум спонтанной хемилюминесцентной кривой относительно контрольных величин. Анализ показателей индуцированной зимозаном хемилюминесценции лейкоцитов крови позволил выявить статистически значимое снижение интенсивности свечения и индекса активации относительно контрольного уровня.

Необходимо отметить, что только в данной группе обследуемых пациентов наблюдается снижение индекса активации лейкоцитов крови в ответ на воздействие реаферона *in vitro*, чего не выявлено ни в группе здоровых детей, ни в группе больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр со средней степенью тяжести заболевания (табл. 1, 2, 3).

Исследование параметров индуцированной зимозаном *in vitro* хемилюминесценции лейкоцитов крови у больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, показало, что независимо от тяжести заболевания под действием реаферона из всех исследуемых нами показателей хемилюминесцентного ответа изменяется только величина индекса активации (табл. 2, 3). При этом установлены разнонаправленные изменения этого показателя относительно контроля у наблюдаемых больных в зависимости от тяжести заболевания. Так, если в группе больных со средней степенью тяжести величина индекса активации имела тенденцию к повышению под действием реаферона, то в группе больных

с тяжелой формой заболевания отмечалась противоположная направленность изменения данного показателя, а именно статистически значимое снижение относительно контрольного уровня. В то же время обнаружено, что лейкоциты крови у больных, имеющих среднюю степень тяжести заболевания изменяют величину индекса активации под влиянием реферона в дозе 0,5 млн МЕ,

а у больных с тяжелой формой инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна-Барр, индекс активации изменяется при воздействии реферона в дозе 1,5 млн МЕ (табл. 2, 3).

Следовательно, результаты проведенного исследования установили у больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, в острый период заболевания

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНТЕРФЕРОНА- α 2 *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ИНФЕКЦИОННЫМ МОНОНУКЛЕОЗОМ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ (Ме; Q_{25} - Q_{75})

Показатели	Контроль (n = 47) 1	0,5 млн МЕ (n = 47) 2	1,0 млн МЕ (n = 47) 3	1,5 млн МЕ (n = 47) 4
Спонтанная хемилюминесценция				
T _{max} (сек.)	469,00 194,00-1025,00	365,00 199,00-1296,00	486,00 196,00-1500,00	432,00 432,00-1637,00
I _{max} (о.е.*10 ³)	3,56 2,16-7,95	3,12 1,59-6,63 0,1 > p ₁ > 0,05	3,49 1,56-6,99	3,92 1,70-7,68
S ₁ (о.е.*10 ⁵)	1,57 0,65-3,05	1,33 0,55-3,65	1,46 0,78-3,10	1,53 0,55-3,33
Индукцированная хемилюминесценция				
T _{max} (сек.)	1539,00 1189,00-2235,00	1632,00 1248,00-2369,00	1632,00 1264,00-1956,00	1683,00 1225,00-2253,00
I _{max} (о.е.*10 ³)	22,36 5,92-41,80	19,63 7,42-42,93	18,54 7,11-42,69	16,64 7,94-45,06
S ₂ (о.е.*10 ⁵)	7,08 1,90-16,60	6,06 2,52-17,10	5,74 2,08-16,90	6,38 2,04-18,60
Индекс активации				
S ₂ / S ₁	4,18 2,07-6,90	5,63 2,00-9,41 0,1 > p ₁ > 0,05	5,77 1,99-10,68	4,50 2,26-8,26

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ИНТЕРФЕРОНА- α 2 *IN VITRO* У БОЛЬНЫХ ТЯЖЕЛОЙ ФОРМОЙ ИНФЕКЦИОННОГО МОНОНУКЛЕОЗА (Ме; Q_{25} - Q_{75})

Показатели	Контроль (n = 18) 1	0,5 млн МЕ (n = 18) 2	1,0 млн МЕ (n = 18) 3	1,5 млн МЕ (n = 18) 4
Спонтанная хемилюминесценция				
T _{max} (сек)	350,00 216,00-1300,00	252,00 207,00-1517,00	261,50 216,00-1059,00	788,50 788,50-1722,00 0,1 > p ₁ < 0,05
I _{max} (о.е.*10 ³)	4,20 2,64-6,05	4,05 2,94-6,06	4,22 2,92-6,23	4,07 2,84-6,56
S ₁ (о.е.*10 ⁵)	1,66 0,73-3,04	1,74 1,43-2,47	1,61 1,23-2,89	1,80 1,12-3,30
Индукцированная хемилюминесценция				
T _{max} (сек)	1610,50 912,00-2302,00	1660,50 1025,00-2054,00	1825,50 972,00-2193,00	1890,50 864,00-2303,00
I _{max} (о.е.*10 ³)	11,89 7,14-37,30	14,19 5,12-27,39	11,70 7,31-26,05	9,63 4,04-23,69 p ₁ < 0,05
S ₂ (о.е.*10 ⁵)	4,51 2,78-15,48	4,23 2,23-15,90	4,44 2,25-15,65	4,20 1,95-10,70
Индекс активации				
S ₂ / S ₁	3,15 1,63-5,67	2,73 1,09-6,86	2,69 1,63-5,82	2,31 1,59-3,44 p ₁ < 0,05

уменьшение диапазона клеточной чувствительности *in vitro* лейкоцитов крови к реаферону, по сравнению с группой здоровых детей.

Вероятно, выявленные изменения могут быть связаны со снижением на поверхности лейкоцитов у больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, в острый период заболевания достаточного количества специфических рецепторов к реаферону или нарушением сигнал-передающего аппарата клетки в целом, возможно, обусловленные цитотоксическим действием вируса. Кроме того, обнаружена зависимость клеточной чувствительности *in vitro* лейкоцитов крови у больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр, от тяжести заболевания.

Заключение

Результаты проведенного исследования выявили особенности клеточной чувствительности лейкоцитов крови *in vitro* к интерферону- $\alpha 2$ у детей в острый период инфекционного мононуклеоза, вызванного вирусом Эпштейна-Барр. Кроме того, установлено, что клеточная чувствительность лейкоцитов крови *in vitro* к интерферону- $\alpha 2$ у данной категории больных в острый период болезни зависит от исследуемой дозы цитокина и от тяжести заболевания. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о необходимости персонализированного подхода к интерферонотерапии у больных инфекционным мононуклеозом, вызванным вирусом Эпштейна-Барр.

Список литературы / References

1. Богомолов С.В. Система интерферона: современные представления о структуре, организации и роли в реализации иммунитета // Инфекционные болезни, 2009. С. 49-53. [Bogomolov S.V. Interferon System: current understanding of the structure, organization and role in the immunity implementation. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2009, no. 1, pp. 49-53. (In Russ.)]
2. Ершов Ф.И. Медицинская значимость интерферонов и их индукторов // Вестник РАМН, 2004. № 2. С. 9-13. [Ershov F.I. Medical importance of interferons and their inducers. *Vestnik RAMN = Bulletin of Academy of Medical Sciences*, 2004, no. 2, pp. 9-13. (In Russ.)]
3. Левина А.С., Железникова Г.Ф., Иванова В.В., Бабченко И.В., Монахова Н.Н., Комелева Е.В., Мурина Е.А. Эффективность иммунокорректирующей терапии при инфекционном мононуклеозе у детей // Детские инфекции, 2009. № 1. С. 60-63. [Levina A.S., Zheleznikova G.F., Ivanova V.V., Babchenko I.V., Monahova N.N., Komeleva E.V., Murina E.A. Efficiency immunocorrective therapy for infectious mononucleosis in children. *Detskie infektsii = Children Infection*, 2009, no. 1, pp. 60-63. (In Russ.)]
4. Патент 2293988 Российская Федерация. Способ оценки чувствительности к интерферону у больных раком почки / Л.М. Куртасова, Е.А. Шкапова, А.А. Савченко, А.И. Крыжановский, Р.А. Зуков, Н.В. Рачкова. № 2005 1006.10; Заявл. 11.01.05; Опубл. 20.02.07, Изобретения. Полезные модели. 2007, Бюл., № 5. 4 с. [Patent 2293988 Russian Federation. A method of evaluating of the sensitivity to interferon at patients with kidney cancer / L.M. Kurtasova, E.A. Shkapova, A.A. Savchenko, A.I. Kryzhanovsky, R.A. Zukov, N.V. Rachkova. No. 2005 1006.10; Stated. 11.01.05; Publ. 20.02.07, Inventions. Utility models. 2007, Bulletin, no. 5, 4 p. (In Russ.)]
5. Nagy N., Klein F. Deficiency of the proapoptotic SAP function in X-linked lymphoproliferative disease aggravates Epstein-Barr virus (EBV) induced mononucleosis and promotes lymphoma development. *Immunol. Letters*, 2010, Vol. 130, pp. 13-18.
6. Milho R., Gill M.B., May J.S., Colaco S., Stevenson P.G. *In vivo* function of the murine herpes-virus-4 ribonucleotide reductase Small subunit. *J. General Virol.*, 2011, Vol. 92, pp. 1550-1560.
7. Odumade O.A., Hogquist K.A., Balfour H.H. Progress and problems in understanding and managing primary Epstein-Barr virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2011, Vol. 24, pp. 193-209.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии, ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Шакина Н.А. — к.м.н., заведующая отделением иммунологических исследований, КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Красноярск, Россия

Шмидт А.Р. — врач-педиатр лечебно-консультативного отделения, КГБУЗ «Красноярский краевой центр по профилактике и борьбе со СПИД», г. Красноярск, Россия

Authors:

Kurtasova L.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Krasnoyarsk, Russian Federation

Shakina N.A., PhD (Medicine), Head, Department of Immunological Studies, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Schmidt A.R., Pediatrician, Medical Advisory Department, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 10.07.2015
Принята к печати 30.08.2015

Received 10.07.2015
Accepted 30.08.2015

ФЕРМЕНТЫ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА В ИММУНОПАТОГЕНЕЗЕ ФИБРОЗНО- КАВЕРНОЗНОГО ТУБЕРКУЛЕЗА ЛЕГКИХ

Дьякова М.Е., Журавлев В.Ю., Эсмедляева Д.С., Перова Т.Л.

*ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства
здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия*

Резюме. Возникновение и развитие туберкулеза легких практически всегда сопровождается явлениями дисфункции со стороны иммунной системы. Ключевые ферменты пуринового метаболизма – аденозиндезаминаза (АДА и ее изоферменты – АДА-1, АДА-1 в комплексе с протеином и АДА-2) и экто-5'-нуклеотидаза (5'-НК), контролирующие уровень аденозина, играют важную роль в регуляции клеточного иммунитета. Показатели пуринового метаболизма были нами сопоставлены с продукцией цитокинов у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких (ФКТ) с выраженным специфическим процессом. В результате наших исследований выявлены ассоциации между продукцией цитокинов и показателями пуринового метаболизма, отражающие важную роль последних в иммунопатогенезе гиперхронического специфического процесса. Главным образом это относится к аденозиндезаминазе: АДА-1 и АДА-2 являются антагонистами в регулировании IL-17 и IL-18. Отмеченное значимое снижение активности внутриклеточной АДА-1, концентрации CD26 и отсутствие ассоциации между ними наряду с ростом активности экто-АДА-2 в целом характерно для больных ФКТ, как возможной модели неблагоприятного по прогнозу развития гиперхронического специфического процесса и согласуется с функциональным истощением иммунокомпетентных клеток. Отсутствие комплексов АДА с эктопептидазами приводит к дисбалансу между поступлением аденозина и его дезаминированием. Увеличение концентрации внеклеточного аденозина при выраженном специфическом процессе может нарушать метаболизм иммунокомпетентных клеток, усугублять течение патологического процесса, в том числе способствуя усилению и прогрессированию легочного фиброза.

Ключевые слова: туберкулез, аденозиндезаминаза, 5'-нуклеотидаза, CD26, цитокины, моноклеары

Адрес для переписки:

*Дьякова Марина Евгеньевна
ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский
институт фтизиопульмонологии» Министерства
здравоохранения РФ
194064, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Политехническая, 32.
Тел.: 8 (812) 297-86-31.
Факс: 8 (812) 297-16-26.
E-mail: marinadyakova@yandex.ru*

Address for correspondence:

*Dyakova Marina Ye.
St. Petersburg Research Institute of Phthysiopulmonology
194064, Russian Federation, St. Petersburg,
Polytechnicheskaya str., 32.
Phone: 7 (812) 297-86-31.
Fax: 7 (812) 297-16-26.
E-mail: marinadyakova@yandex.ru*

Образец цитирования:

*М.Е. Дьякова, В.Ю. Журавлев, Д.С. Эсмедляева, Т.Л. Перова,
«Ферменты пуринового метаболизма в иммунопатогенезе
фиброзно-кавернозного туберкулеза легких» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 85-90.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-85-90*

© Дьякова М.Е. и соавт., 2016

For citation:

*M.Ye. Dyakova, V.Yu. Zhuravlev, D.S. Esmedyayeva, T.L. Perova,
“Role of purine metabolism enzymes in immune pathogenesis of
fibro-cavernous pulmonary tuberculosis”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 1,
pp. 85-90. doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-85-90*

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-85-90>

ROLE OF PURINE METABOLISM ENZYMES IN IMMUNE PATHOGENESIS OF FIBRO-CAVERNOUS PULMONARY TUBERCULOSIS

Dyakova M.Ye., Zhuravlev V.Yu., Esmedlyaeva D.S., Perova T.L.

St. Petersburg Research Institute of the Phthysiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Emergence and development of pulmonary tuberculosis is often accompanied by the signs of immune system dysfunction. The key enzymes of purine metabolism, e.g., adenosine deaminase (ADA and its isoforms, i.e. ADA1, ADA1 protein complex, and ADA-2), ecto-5'-nucleotidase (5'-NC) controlling adenosine levels, may play an important role in regulation of cell-mediated immunity. We have correlated the parameters of purine metabolism with cytokine production in patients with fibro-cavernous pulmonary tuberculosis (FCT) with a severe specific process. Our studies have revealed an association between cytokine production and purine metabolism indexes, thus reflecting an important role of the latter in immunopathogenesis of the hyperchronic specific disorder. It is mainly referred to adenosine deaminase (ADA1 and ADA2) which are antagonistic in regulation of IL-17 and IL-18. A significantly decreased activity of intracellular ADA1, lowered CD26 concentrations, with lacking intercorrelation, along with increased activity of ecto-ADA-2 is, generally, typical to patients with fibrous-cavernous tuberculosis, thus being a possible marker for prediction of unfavorable hyperchronic specific process, being consistent with functional depletion of immunocompetent cells. Lack of the ADA/ecto-peptidase complexes leads to an imbalance between adenosine supply and its deamination. Increased extracellular adenosine concentrations in the patients with severe specific processes may cause metabolic alterations of immunocompetent cells, thus complicating clinical course of the disease, e.g., contributing to enhancement and progression of pulmonary fibrosis.

Keywords: tuberculosis, adenosine deaminase, ecto-5'-nucleotidase, CD26, cytokines, mononuclear cells

Введение

Возникновение и развитие туберкулеза легких практически всегда сопровождается явлениями дисфункции со стороны иммунной системы. Ключевые ферменты пуринового метаболизма – аденозиндеаминаза (АДА и ее изоферменты – АДА-1 и АДА-2) и экто-5'-нуклеотидаза (5'-НК), контролирующая уровень аденозина, играют важную роль в регуляции клеточного иммунитета [7]. АДА-1 увеличивает пролиферацию CD4⁺T-клеток, стимулирует пролиферацию антиген-активированных Т-клеток, продуцирующих IFN γ [15]. АДА-1 – в комплексе с протеином, идентифицированная как дипептидилпептидаза IV (DPPIV), присутствует в качестве эктоэнзима на различных клетках [6]. Установлено, что DPPIV – активационный антиген CD26, способствующий регуляции продукции цитокинов за счет активации Т-лимфоцитов [10, 14]. Образование комплекса CD26 с АДА-1 на мембране Т-лимфоцитов индуцирует костимуляторный эффект в активации Т-клеток, что приводит к усилению продукции Th1-клеток и провоспалительных цитокинов [14]. АДА-2 увеличивает пролиферацию CD4⁺T-клеток, индуцирует дифференциацию моноцитов в макрофаги с последующей пролиферацией макрофагов. Уровень секреции АДА-2 макрофагами ингибирует IFN γ [15].

Важным антигеном иммунокомпетентных клеток является экто-5'-нуклеотидаза, регулируя их созревание и адгезию к эндотелию [12].

Ранее нами было показано, что при туберкулезе легких повышение активности АДА в сыворотке крови отражает выраженность угнетения клеточного звена иммунитета и может использоваться в качестве ориентировочного теста функционального состояния иммунной системы [2, 4].

Цель исследования – изучить взаимосвязь ферментов пуринового метаболизма с продукцией цитокинов для понимания их роли в иммунопатогенезе специфического процесса у больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких, как возможной модели неблагоприятного по прогнозу развития гиперхронического специфического процесса.

Материалы и методы

Обследован 21 больной фиброзно-кавернозным туберкулезом легких с выраженным специфическим процессом (ФКТ) (16 мужчин и 5 женщин) в возрасте 22,0-62,0 лет (M-38,0) на фоне подготовке к этапу хирургического лечения. В референсную (контрольную) группу были включены 30 практически здоровых доноров с сопоставимыми характеристиками по полу

и возрасту. Активность АДА, 2-деоксиАДА в сыворотке крови и в лизатах мононуклеаров (мн), получаемых путем повторного замораживания и оттаивания, регистрировали методом G. Giusti (1974). По результатам их одновременного исследования рассчитывали активность изоферментов АДА-1 и АДА-2. Уровень 5'-НК в сыворотке крови, CD26 в сыворотке, мононуклеарах крови определяли иммуноферментным набором Elisa (Ecto NT5E, «USCN», Китай и Human sCD26 Platinum ELISA, «eBioscience», Австрия).

Концентрацию цитокинов (IL-10, IL-17, IL-18), IFN γ , TNF α в цельной крови, индуцированных туберкулином (PPD или туберкулин) и не стимулированных, определяли методом иммуноферментного анализа, используя тест-системы производства «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в соответствии с инструкциями производителя. PPD является смесью более чем 200 белков *M. Tuberculosis* (Mtb) [1].

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета прикладных программ Statistica 7.0. Метрические показатели представлялись в виде среднего и ошибки среднего ($X \pm m$), порядковые в виде минимум-максимум. Оценка достоверности различия метрических показателей проводилась с использованием непараметрического U-критерия Вилкоксона–Манна–Уитни, проверка значимости результатов ранговых коэффициентов корреляции Спирмена на основе статистики Стьюдента.

Результаты и обсуждение

У больных ФКТ, по сравнению с референсной группой, выявлены изменения показателей пуринового метаболизма. В сыворотке крови отмечен рост активности АДА ($20,6 \pm 2,28$ ед/л

против $14,1 \pm 0,24$ ед/л; $p = 0,0004$) за счет увеличения АДА-2 (экто-АДА-2; $17,5 \pm 1,99$ ед/л против $10,97 \pm 0,24$ ед/л; $p = 0,00005$) при снижении активности АДА-1 (экто-АДА-1; $3,09 \pm 0,63$ ед/л против $3,27 \pm 0,16$ ед/л; $p = 0,03$). И, как следствие этого, выявлено нарушение динамического равновесия изоферментного спектра АДА: снижение доли АДА-1 и рост АДА-2 ($15,28 \pm 2,94$ против $23,64 \pm 1,17$; $p = 0,00008$ и $84,72 \pm 2,94$ против $78,26 \pm 1,5$; $p = 0,002$ для АДА-1/АДА и АДА-2/АДА соответственно).

В мононуклеарах выявлено снижение активности АДА ($p = 0,002$) за счет уменьшения АДА-1мн ($p = 0,00004$) при сохранении в пределах референсного диапазона АДА-2мн (рис. 1.). Доля каждого изофермента в общей активности АДА в мононуклеарах не отличалась от референсных значений, что указывало на сохранение в них пуринового гомеостаза.

Уровень CD26 был снижен как в сыворотке ($467,4 \pm 88,0$ нг/мл против $710,0 \pm 59,6$ нг/мл; $p = 0,02$) (растворимая форма эктопептидазы), так и в мононуклеарах ($4,6 \pm 1,2$ нг/ 10^6 против $20,56 \pm 4,2$ нг/ 10^6 ; $p = 0,0004$). Напротив, уровень другой эктопептидазы – 5'-НК – превышал референсный диапазон в 4,1 раза ($0,91 \pm 0,20$ нг/мл против $0,23 \pm 0,09$ нг/мл; $p = 0,01$).

АДА-2 экспрессируется моноцитами/макрофагами в ответ на инвазию патогенов (Mtb) в места с высокой концентрацией аденозина и низким рН [15]. У больных ФКТ по отсутствию связей между показателями АДА сыворотки и мононуклеаров можно предположить, что рост активности внеклеточной АДА-2 происходит вследствие разрушения (лизиса) макрофагов.

Установленная у больных ФКТ отрицательная взаимосвязь между CD26 сыворотки и мо-

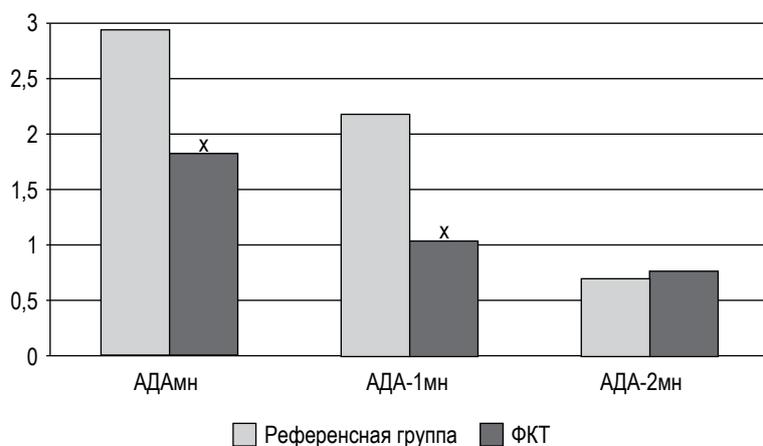


Рисунок 1. Показатели внутриклеточной активности аденозиндеаминазы у больных ФКТ

Примечание. x – значимое отличие от референсной группы.

нонуклеаров ($r = -0,48$, $p = 0,04$) может свидетельствовать о возможности происхождения растворимой формы эктопептидазы вследствие секреции из мононуклеаров, так как появление растворимой формы CD26 может быть частично связано с протеолитическим расщеплением и/или секрецией клеточной CD26 [8].

Проведенный корреляционный анализ не выявил ассоциаций между активностью АДА и уровнем эктопептидаз, но у больных ФКТ зарегистрировано снижение активности АДА-1 сыворотки (экто-АДА-1). CD26 – сенсор экто-АДА, экспрессируемой из клетки или освобождаемой после гибели клетки. Возможно, при ФКТ именно после гибели (лизиса) клеток появилась экто-АДА-1, которая могла образовать комплекс с CD26, образование которого может индуцировать костимуляторный ответ в активации Т-клеток, независимо от энзиматической активности [13, 14].

Показатели пуринового метаболизма были сопоставлены с продукцией цитокинов. Полученные результаты свидетельствуют о разнонаправленной спонтанной продукции цитокинов, участвующих в запуске и контроле воспалительных и клеточно-опосредованных иммунных реакций: повышение секреции IL-18 ($90,0 \pm 7,1$ пг/мл против $56,9 \pm 13,7$ пг/мл; $p = 0,0015$) наряду со снижением уровня TNF α ($2,66 \pm 1,41$ пг/мл против $11,24 \pm 2,5$ пг/мл; $p = 0,04$) и сохранением в пределах референсного диапазона продукции IL-17 и IFN γ . Уровень базальной продукции иммуносупрессорного цитокина IL-10 был аналогичен таковому в референсной группе. Интенсивность секреции провоспалительных цитокинов (рис. 2), индуцированных специфическим антигеном PPD, также была разнонаправленной: отмечен рост IFN γ ($p = 0,001$) и IL-18 ($p = 0,0001$) наряду со снижением уровня TNF α ($p = 0,048$)

и сохранением продукции IL-17 в пределах референсных величин из-за большой вариабельности индивидуальных значений. А уровень секреции противовоспалительного и иммуносупрессорного цитокина IL-10 был снижен ($p = 0,0028$).

Выявленная нами у больных ФКТ усиленная секреция IFN γ , индуцированная PPD может свидетельствовать о сохранении при наличии гиперхронического течения специфического процесса выраженного клеточного специфического ответа. При проведении корреляционного анализа выявлена положительная связь между разнонаправленными уровнями IFN γ и TNF α , стимулированными туберкулином ($r = 0,67$; $p = 0,05$), иллюстрирующая синергичную продукцию данных цитокинов, необходимую для контроля Mtb [9]. При этом не выявлена взаимосвязь между повышенной продукцией IFN γ и IL-18, плейотропным провоспалительным цитокином, стимулирующим продукцию IFN γ [5]. Способность IL-17 индуцировать секрецию IFN γ подтверждает корреляция между данными цитокинами при индукции PPD ($r = 0,7$; $p = 0,05$). Выявленные ассоциации между индуцированной PPD продукцией иммуносупрессорного цитокина IL-10 и провоспалительных, иммунорегуляторных цитокинов IL-18, TNF α ($r = 0,68$; $p = 0,04$ и $r = 0,74$; $p = 0,037$ соответственно) можно охарактеризовать как баланс про- и противовоспалительных цитокинов. При этом IL-18 обладает как про-, так и противовоспалительной активностью [5]. IL-10 ингибирует экспрессию провоспалительных цитокинов, в частности TNF α [9]. Дефицит продукции TNF α может обуславливать функциональную инертность иммуноцитов и, как следствие, хронизацию, прогрессирование и неблагоприятное течение туберкулезного процесса [3].

При проведении корреляционного анализа выявлена ассоциированность показателей пу-

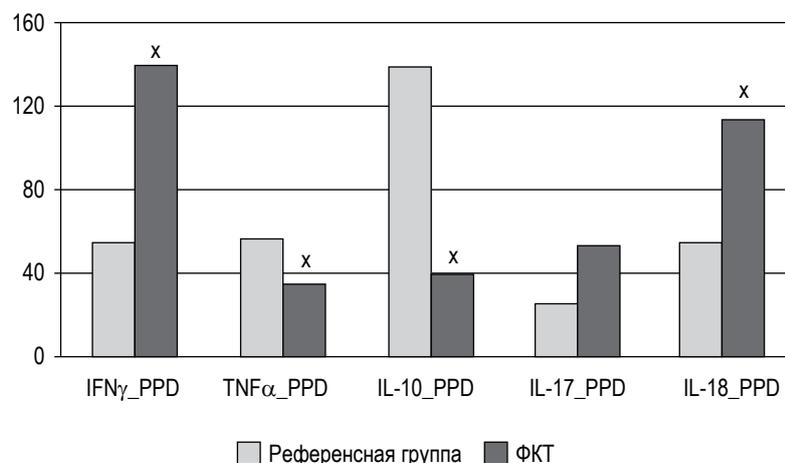


Рисунок 2. Концентрация цитокинов, индуцированных PPD у больных ФКТ

Примечание. x – значимое отличие от референсной группы.

ТАБЛИЦА 1. РЕЗУЛЬТАТЫ КОРРЕЛЯЦИОННОГО АНАЛИЗА МЕЖДУ ФЕРМЕНТАМИ ПУРИНОВОГО МЕТАБОЛИЗМА И ПРОДУКЦИЕЙ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ ФКТ

Пары признаков		Коэффициент, значимость корреляций
АДА-1	TNF α _PPD	$r = 0,62$; $p = 0,04$
	IL-18	$r = -0,77$; $p = 0,027$
АДА-2	IL-10	$r = -0,78$; $p = 0,008$
АДА-2/АДА	IL-18	$r = 0,90$; $p = 0,002$
АДА-2мн	IL-17_PPD	$r = -0,82$; $p = 0,007$
АДА-1мн/ АДАмн	IL-17_PPD	$r = 0,86$; $p = 0,0027$
CD26	IFN γ _PPD	$r = -0,61$; $p = 0,048$
5'-НК	IL-10	$r = -0,68$; $p = 0,03$

ринового метаболизма с продукцией цитокинов (табл. 1). АДА обладает костимуляторным эффектом благодаря способности позитивно регулировать продукцию Th1-цитокинов, в частности TNF α [14]. Снижение активности АДА-1 приводит к росту аденозина, который ингибирует продукцию провоспалительных цитокинов (TNF α), но индуцирует секрецию IL-10 [11]. АДА-2 экспрессируется моноцитами в сторону повышения аденозина и у больных ФКТ отмечен рост активности АДА-2, которая дезаминирует внеклеточный аденозин, что, вероятно, и объясняет обратную связь АДА-2 и IL-10. Интересно отметить разнонаправленность корреляций между провоспалительными цитокинами (IL-17 и IL-18) и АДА-1 и АДА-2, т.е. лимфоцитарного и моноцитарного звена иммунитета. АДА-1 позитивно регулирует IL-17 (Th17), а АДА-2 – IL-18 (Th1-путь иммунного ответа). Значительный рост АДА-2 согласуется с активностью процесса, а IL-18 может выступать в качестве патогенети-

ческого фактора в формировании заболеваний, сопровождающихся острым и хроническим воспалением [5]. Выявленная обратная корреляция между индуцированной PPD продукцией IFN γ и уровнем CD26 иллюстрирует способность IFN γ регулировать экспрессию CD26 и функцию DPPiV [6]. Принимая во внимание полученную обратную связь между уровнем 5'-НК и продукцией IL-10, можно предположить недостаточность концентрации аденозина для усиления продукции данного иммуносупрессорного цитокина.

Выявленные корреляционные связи между продукцией цитокинов и показателями пуринового метаболизма отражают важную роль последних в иммунопатогенезе гиперхронического специфического процесса. Главным образом это относится к аденозиндезаминазе: АДА-1 и АДА-2 являются антагонистами в регулировании IL-17 и IL-18; АДА-1 регулирует Th1- и Th17-, а АДА-2 – Th1- и Th2-пути иммунного ответа.

Отмеченное значимое снижение активности внутриклеточной АДА-1, концентрации CD26 и отсутствие ассоциации между ними, наряду с ростом активности экто-АДА-2, в целом характерно для больных ФКТ, как возможной модели неблагоприятного по прогнозу развития гиперхронического специфического процесса и согласуется с функциональным истощением иммунокомпетентных клеток. Отсутствие комплексов АДА с эктопептидазами (CD26 и 5'-НК) приводит к дисбалансу между поступлением аденозина и его дезаминированием. Увеличение концентрации внеклеточного аденозина при выраженном специфическом процессе может нарушать метаболизм иммунокомпетентных клеток, усугублять течение патологического процесса, в том числе способствуя усилению и прогрессированию легочного фиброза.

Список литературы / References

1. Кисина Т.Е., Фрейдлин И.С., Кноринг Б.Е., Басек Т.С., Елькин А.В. Особенности специфического иммунного ответа у отдельных больных фиброзно-кавернозным туберкулезом легких // Медицинская иммунология, 2006. Т. 8, № 4. С. 501-510. [Kissina T.E., Freidlin I.S., Knoring B.E., Basek T.S., Elkin A.V. Features of specific immune response in the patients with fibrous/cavernous tuberculosis of lungs. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2006, Vol. 8, no. 4, pp. 501-510. doi: 10.15789/1563-0625-2006-4-501-510 (In Russ.)]
2. Кноринг Б.Е., Титаренко О.Т., Сахарова И.Я., Дьякова М.Е., Логинова Г.П. Взаимосвязь продукции цитокинов и активности аденозиндезаминазы при туберкулезе легких // Проблемы туберкулеза и болезни легких, 2000. № 3. С. 38-41. [Knoring B.E., Titarenko O.T., Sakharova I.Ya., Dyakova M.Ye., Loginova G.P. Correlation of cytokine production and activity of adenosine deaminase in pulmonary tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i bolezni legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2000, no. 3, pp. 38-41. (In Russ.)]
3. Новицкий В.В., Уразова О.И., Стрелис А.К., Воронкова О.В., Сеницына В.А., Пирогова Н.П., Филинчук О.В., Земляная Н.А., Перевозчикова Т.В., Шилько Т.А., Есимова И.Е., Рябова Е.А. Мононуклеарные клетки периферической крови у больных лекарственно-чувствительным и лекарственно-устойчивым туберкулезом легких // Вестник Российской АМН, 2006. № 2. С. 30-35. [Novitsky V.V., Urazova O.I., Strelis A.K., Voronkova O.V., Sinitsina V.A., Pirogova N.P., Filinyuk O.V., Zemlyanaya N.A., Perevozchikova T.V., Shilko T.A., Yesimova I.Ye., Ryabova Ye.A. Peripheral blood mononuclear leucocytes in patients with drug-sensitive and drug-

resistant pulmonary tuberculosis. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh Nauk = Bulletin of the Russian Academy of Sciences*, 2006, no. 2, pp. 30-35. (In Russ.)

4. Титаренко О.Т., Дьякова М.Е., Перова Т.Л., Ряснянская Т.В. Активность аденозиндезаминазы и ее изоферментов у больных с различными формами туберкулеза // Проблемы туберкулеза и болезни легких, 2002. № 3. С. 43-45. [Titarenko O.T., Dyakova M.E., Perova T.L., Rysnyanskaya T.V. Activity of adenosine deaminase and its isoenzymes in patients with different forms of tuberculosis. *Problemy tuberkuleza i bolezni legkikh = Problems of Tuberculosis and Lung Disease*, 2002, no. 3, pp. 43-45. (In Russ.)]

5. Якушенко Е.В., Лопатникова Ю.А., Сенников С.В. Интерлейкин-18 и его роль в иммунном ответе // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 355-364. [Yakushenko E.V., Lopatnikova Yu.A., Sennikov S.V. IL-18 and immunity. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 17, no. 4, pp. 355-364. doi: 10.15789/1563-0625-2005-4-355-364 (In Russ.)]

6. Cordero O.J., Salgado F.J., Fernández-Alonso C.M., Herrera C., Lluís C., Franco R., Nogueira M. Cytokines regulate membrane adenosine deaminase on human activated lymphocytes. *J. of Leuk. Biol.*, 2001, Vol. 70, pp. 920-930.

7. Eckle T., Koepfen M., Eltzsching H.K. Role of extracellular adenosine in acute lung injury. *Physiology*, 2009, Vol. 24, no. 5, pp. 298-306.

8. Erić-Nikolić A.I., Matić I.Z., Dorđević M., Milovanović Z., Marković I., Džodić R., Inić M., Srdić-Rajić T., Jevrić M., Gavrilović D., Cordero O.J., Juranić Z.D. Serum DPPIV activity and CD26 expression on lymphocytes in patients with benign or malignant breast tumors. *Immunobiology*, 2011, Vol. 216, pp. 942-946.

9. Etna M.P., Giacomini E., Severa M., Coccia E.M. Pro- and anti-inflammatory cytokines in tuberculosis: a two-edged sword in TB pathogenesis. *Seminars in Immunology*, 2014, Vol. 26, pp. 543-551.

10. Gorrell M.D., Gysbers V., Mccaughan W. CD 26: a multifunctional integral membrane and secreted protein of activated lymphocytes. *Scand. J. Immunol.*, 2001, Vol. 54, pp. 249-264.

11. Hasko G., Cronstein B.N. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity. *Trends Immunol.*, 2004, Vol. 25, pp. 33-39.

12. Hunsucker S.A., Mitchell B.S., Sychala J. The 50-nucleotidases as regulators of nucleotide and drug metabolism. *Pharmacol. Ther.*, 2005, Vol. 107, pp. 1-30.

13. Martin M., Huguet J., Centelles J., Franco R.: Expression of ecto-adenosine deaminase and CD26 in human T cells triggered by the TCR-CD3 complex. Possible role of adenosine deaminase as costimulatory molecule. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 155, pp. 4630-4643.

14. Pacheco R., Martinez-Navio J.M., Lejeune M., Climent N., Oliva H., Gatell J.M., Gallart T., Mallol J., Lluís C., Franco R. CD26, adenosine deaminase, and adenosine receptors mediate costimulatory signals in the immunological synapse. *PNAS*, 2005, Vol. 102, no. 27, pp. 9583-9588.

15. Zavialov A.V., Gracia E., Gleichhaus N., Franco R., Zavialov A.V., Lauvau G. Human adenosine deaminase 2 induces differentiation of monocytes into macrophages and stimulates proliferation of T helper cells and macrophages. *J. of Leukocyte Biology*, 2010, Vol. 88, no. 2, pp. 279-290.

Авторы:

Дьякова М.Е. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патогенетической диагностики ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Журавлев В.Ю. — к.м.н., руководитель отдела лабораторной диагностики ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Эсмедляева Д.С. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патогенетической диагностики ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Перова Т.Л. — научный сотрудник лаборатории патогенетической диагностики ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Dyakova M. Ye., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Pathogenetic Diagnostics, St. Petersburg Research Institute of Phthysiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Zhuravlev V. Yu., PhD (Medicine), Head, Department of Laboratory Diagnostics, St. Petersburg Research Institute of Phthysiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Esmedlyaeva D. S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Pathogenetic Diagnostics, St. Petersburg Research Institute of Phthysiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Perova T. L., Research Associate, Laboratory of Pathogenetic Diagnostics, St. Petersburg Research Institute of Phthysiopulmonology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 10.08.2015

Отправлена на доработку 07.09.2015

Принята к печати 21.09.2015

Received 10.08.2015

Revision received 07.09.2015

Accepted 21.09.2015

ДИНАМИКА УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ

Захватов А.Н., Козлов С.А., Аткина Н.А., Дудоров И.И.

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Резюме. В эксперименте на 105 белых нелинейных крысах изучена динамика некоторых показателей цитокинового профиля при моделировании посттравматического артрита коленного сустава на фоне комбинированного зондового перорального введения нимесулида и внутрисуставного введения этоксида. Установлено, что при травме коленного сустава наблюдается высокий уровень провоспалительных и противовоспалительных цитокинов, что свидетельствует о развитии местного иммуновоспалительного процесса. Использование комбинированного введения нимесулида и этоксида способствовало значительному снижению уровня всех пулов цитокинового профиля к концу эксперимента, приближая их значения к данным интактных животных.

Ключевые слова: посттравматический артрит, цитокины, нимесулид, этоксидол

TIME COURSE OF CYTOKINE LEVELS IN EXPERIMENTAL POSTTRAUMATIC ARTHRITIS

Zahvatov A.N., Kozlov S.A., Atkina N.A., Dudorov I.I.

N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Abstract. An experimental model of post-traumatic arthritis of knee was developed in a series of 105 white non-inbred rats. Time-dependent changes of some cytokines were studied upon combined treatment with oral nimesulide and intra-articular etoxydole injections. It was found that the knee joint injury we observed increased levels of pro- and anti-inflammatory cytokines, which may reflect a development of local immunological response. Combined application of nimesulide and etoxydole contributed to significant reduction in all cytokine pools at the end of observation, bringing their levels to normal ranges typical to the intact animals.

Keywords: post-traumatic arthritis, cytokines, nimesulide, etoxydol

Адрес для переписки:

Захватов Алексей Николаевич
ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет
имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия
431510, Россия, Республика Мордовия, Лямбирский район,
с. Лямбиров, ул. Ленина, 53-17.
Тел.: 8 (917) 072-87-83.
E-mail: zachvatan78@mail.ru

Address for correspondence:

Zahvatov Alexey N.
N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation
431510, Russian Federation, Republic of Mordovia, Lyambir,
Lenin str., 53-17.
Phone: 7 (917) 072-87-83.
E-mail: zachvatan78@mail.ru

Образец цитирования:

А.Н. Захватов, С.А. Козлов, Н.А. Аткина, И.И. Дудоров,
«Динамика уровня цитокинов при экспериментальном
посттравматическом артрите» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 1. С. 91-96.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-91-96

© Захватов А.Н. и соавт., 2016

For citation:

A.N. Zahvatov, S.A. Kozlov, N.A. Atkina, I.I. Dudorov, "Time
course of cytokine levels in experimental posttraumatic arthritis",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 1, pp. 91-96.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-1-91-96

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-1-91-96>

Введение

Патогенетические механизмы посттравматического артрита, приводящие к развитию дегенеративно-деструктивных процессов в суставе, отличаются многофакторностью и до сих пор до конца не выяснены. Есть основания полагать, что определенное значение в разрушении суставного хряща может играть иммунная система [5, 6, 7].

Важная роль в развитии посттравматического воспалительного процесса в суставе отводится цитотоксическим эффектам провоспалительных цитокинов, обуславливающим деструктивные поражения хряща и субхондральной кости [1]. В последние годы немалое значение в патогенезе посттравматического артрита также отводится процессам перекисного окисления липидов и состоянию защитной антиоксидантной системы [3, 9].

Цитокин-опосредованная иммунная реакция, возникающая при травме в ответ на повреждение тканей, на раннем этапе играет роль защитного механизма, но гиперреактивность и связанная с ней избыточная и не контролируемая секреция провоспалительных и противовоспалительных цитокинов трансформирует первоначально защитный механизм в патологический процесс [8]. Это приводит к иммунологической перестройке организма, следствием чего является развитие нарушений в поврежденном суставе, приводящих к дегенеративно-деструктивным изменениям хрящевой ткани и синовиальной оболочки [4].

С этой точки зрения патогенетическое обоснование имеет применение препаратов, обладающих ингибирующим влиянием на синтез провоспалительных цитокинов, а также оказывающих антиоксидантное и антигипоксантное действие. В этом плане наше внимание привлекли препараты нимесулид и этоксилол, комбинированное введение которых наиболее целесообразно при посттравматическом артрите. За счет оказания противовоспалительного эффекта нимесулида и антиоксидантного и антигипоксантного действия этоксилола происходит потенцирование лечебных эффектов обоих препаратов.

Учитывая вышеизложенное, **целью исследования** явилось изучение динамики цитокинового профиля при травматическом повреждении коленного сустава в эксперименте на фоне комбинированного перорального введения нимесулида и внутрисуставного введения этоксилола.

Материалы и методы

Работа выполнена на кафедре общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева». Эксперименты проведены на 105 белых нелинейных крысах обоего пола массой 180-200 г, содержащихся в стандартных условиях вивария ФГБОУ ВПО «МГУ им. Н.П. Огарева».

Животные были разделены на 4 серии. Первую серию составили интактные животные в количестве 15 особей. Во второй (30 крыс), третьей (30 крыс), четвертой (30 крыс) производилось моделирование травмы коленного сустава механическим путем по методике Г.М. Дубровина (2005) [2]. Под ингаляционным наркозом в асептических условиях рассекали кожу, фасцию и капсулу сустава. В полость сустава вводили иглу Дюфо, обточенную под углом 90° и ориентированную на хрящ внутреннего мыщелка бедренной кости. Винчивающими движениями перфорировали суставной хрящ до упора в субхондральную кость, затем иглу удаляли. Получение фрагмента суставного хряща контролировали мандреном. Швы на рану накладывали через все слои.

Во второй (контрольной) серии лечение не проводилось. Животные третьей опытной серии получали нимесулид перорально через зонд в среднетерапевтической дозе 2 мг/кг ежедневно в течение 10 дней. На животных четвертой экспериментальной серии изучалась эффективность комбинированной пероральной терапии нимесулидом в дозе 2 мг/кг по вышеуказанной схеме введения и внутрисуставной терапии 3-гидроксиэтилпиридина малатом (этоксидолом) в дозе 5 мг/кг через день. Продолжительность курса составляла 5 инъекций. На данную методику получен патент на изобретение № 2516951 от 26.03.14 г.

Цитокиновый профиль исследовали по уровню провоспалительных (IL-1 β , IL-17, TNF α), регуляторных (IL-2, IL-6) и противовоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа в «sandwich» варианте с применением пероксидазы в качестве индикаторного фермента с использованием набора реагентов фирмы Bender Medsystems (Австрия) для крыс. Для регистрации результатов использовали иммуноферментный анализатор «Multiscan». Количество цитокинов выражали в пикограммах на мл (пг/мл). Исследования проводились на 3, 15 и 28 сутки эксперимента. Животных выводили из эксперимента в соответствии с Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях, при-

нятой Советом Европы в 1986 г. путем декапитации после предварительного внутривенного введения раствора тиопентала натрия в дозе 100 мг/кг. Статистическая обработка результатов исследований проведена с помощью t-критерия Стьюдента. Изменения считали достоверными при p меньше 0,05; 0,01; 0,001.

Результаты и обсуждение

Моделирование посттравматического артрита в эксперименте уже в ранние сроки сопровождалось значительным повышением уровня всех пулов цитокинов, а также нарушением баланса между ними. Происходило нарушение физиологического равновесия между провоспалительными (IL-1, TNF α) и противовоспалительными (IL-4, IL-10) цитокинами со сдвигом в сторону первых, под действием которых хондроциты синтезируют протеолитические ферменты (матриксные протеиназы, коллагеназы), вызывающие деградацию коллагена и протеогликана хряща. Высокие уровни всех пулов цитокинов в крови животных контрольной серии сохранялись вплоть до конца эксперимента (рис. 1). Данный факт указывает на необходимость медикаментозной коррекции цитокинового дисбаланса, приводящего к хронизации процесса и дальнейшей деструкции хряща.

При применении нестероидной противовоспалительной терапии в виде зондового перорального введения нимесулида в дозе 2 мг/кг к концу эксперимента происходило снижение уровня

провоспалительных цитокинов по сравнению с данными контрольной серии. Так, концентрации TNF α , IL-1 β и IL-17 были ниже на 19,1%, 12,4% и 22,7% соответственно. Также получены статистически значимые отличия в отношении регуляторных цитокинов – снижение уровня IL-6 на 36,6% и IL-2 на 39,2%. Подобные изменения наблюдались и при исследовании противовоспалительных цитокинов. Отмечалось уменьшение концентраций IL-4 и IL-10 на 36,1% и 30,1% соответственно. Несмотря на данную положительную динамику, уровни маркеров воспаления значительно превышали значения животных интактной серии, что говорит о недостаточной эффективности нимесулида в виде монотерапии посттравматических артритов.

При комбинации нимесулида с внутрисуставным введением этиксидаола наблюдался наибольший положительный эффект в лечении посттравматических изменений суставов. Так, уровни провоспалительных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-17 по сравнению с данными контрольной серии уменьшились на 59,8% ($p_3 < 0,001$), 50,2% ($p_3 < 0,001$) и 48,2% ($p_3 < 0,001$) соответственно. Также достоверно отличались регуляторные и противовоспалительные цитокины – наблюдалось снижение уровня IL-6 на 58% ($p_3 < 0,001$), IL-2 на 67,1% ($p_3 < 0,001$) и IL-4 на 62,5% ($p_3 < 0,001$), IL-10 на 64,3% ($p_3 < 0,001$).

По сравнению с данными серии с применением нимесулида в соответствующие сроки уровни деструктивных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-17

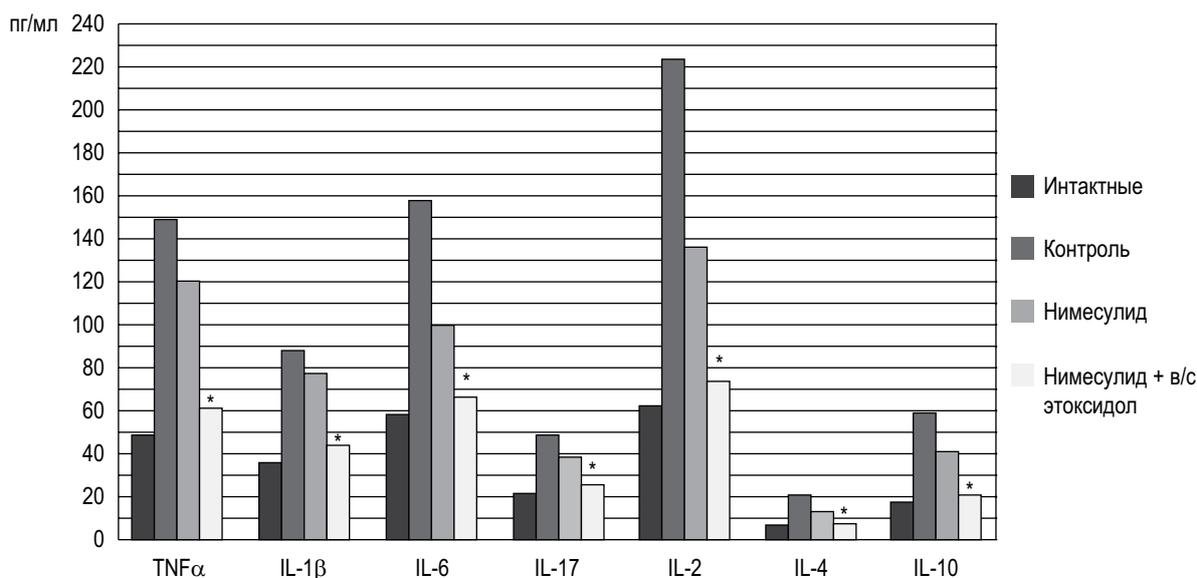


Рисунок 1. Сравнительная характеристика уровня цитокинов в плазме крови лабораторных животных всех серий при посттравматическом артрите. 28 суток эксперимента

Примечание. * – достоверность показателя по отношению к данным контрольной серии ($p_3 < 0,001$).

ТАБЛИЦА 1. ДИНАМИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЦИТОКИНОВОГО ПРОФИЛЯ ПРИ ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОМ АРТРИТЕ НА 28 СУТКИ ЭКСПЕРИМЕНТА (M±m)

Показатель, пг/мл	Интактные животные (n = 15)	Контрольная серия (n = 30)	Нимесулид per os (n = 30)	Нимесулид per os и в/с этоксилол (n = 30)
TNF α	48,69±0,72	148,4±2,12 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	120,15±3,13 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,001	61,14±2,17 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-1 β	35,61±1,04	87,76±2,03 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,01	76,97±2,07 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001	43,69±1,54 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-6	57,43±0,85	157,94±2,39 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	100,24±2,58 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,001 p ₃ < 0,001	66,37±2,41 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-17	21,43±0,18	48,52±1,19 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	37,51±1,13 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001	25,04±1,21 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL -2	62,72±1,43	223,46±4,03 p < 0,001 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	135,87±3,42 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001	73,57±2,62 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-4	6,59±0,49	19,25±0,53 p < 0,001 p ₁ < 0,01 p ₂ > 0,05	12,34±0,53 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,01 p ₃ < 0,001	7,23±0,31 p > 0,05 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,01 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001
IL-10	17,04±0,68	58,39±0,82 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ > 0,05	40,82±1,45 p < 0,001 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,05 p ₃ < 0,001	20,84±0,89 p > 0,05 p ₁ < 0,001 p ₂ < 0,001 p ₃ < 0,001 p ₄ < 0,001

Примечание. p – достоверность отличий к данным интактных животных; p₁ – к данным соответствующей серии на 3 сутки; p₂ – к данным соответствующей серии на 15 сутки; p₃ – достоверность отличий к данным контрольной серии на соответствующие сутки; p₄ – достоверность отличий к данным НПВС-терапии на соответствующие сутки.

снижались на 49,1% ($p_4 < 0,001$), 43,2% ($p_4 < 0,001$) и 33,3% ($p_4 < 0,001$) соответственно. Позитивная тенденция наблюдалась в отношении регуляторных и противовоспалительных цитокинов. Отмечалось уменьшение концентраций IL-6 и IL-2 на 33,8% ($p_4 < 0,001$) и 44,1% ($p_4 < 0,001$) и IL-4 и IL-10 на 34,3% ($p_4 < 0,001$) и 45,9% ($p_4 < 0,001$) соответственно.

При сравнительной оценке полученных данных с показателями интактных животных было выявлено, что на фоне сочетанного применения антиоксиданта этоксида и НПВС нимесулида уровни маркеров воспаления приближались к должным величинам. Так, концентрация деструктивных цитокинов TNF α , IL-1 β и IL-17 к концу эксперимента превышала нормальные показатели в 1,25 ($p < 0,001$), 1,22 ($p < 0,001$) и 1,16 раза ($p < 0,001$) соответственно. Если сравнить данные контрольной серии на 28 сутки с данными интактной серии, мы увидим, что TNF α , IL-1 β и IL-17 превышали нормальные показатели в 3,04 раза ($p < 0,001$), 2,46 раза ($p < 0,001$) и 2,26 раза ($p < 0,001$) соответственно. Регуляторные цитокины IL-6 и IL-2 к концу комбинированной терапии также незначительно превышали нормальные показатели – в 1,15 ($p < 0,001$) раза и 1,17 ($p < 0,001$) раза соответственно. В отношении противовоспалительных

цитокинов статистически значимых различий не наблюдалось ($p > 0,05$) (табл. 1).

Исходя из вышеизложенного, можно сделать вывод, что наиболее эффективным методом коррекции показателей цитокинового профиля при посттравматическом артрите в эксперименте является комбинированное пероральное введение НПВС (в данном случае – нимесулида в дозе 2 мг/кг) и внутрисуставное введение антиоксиданта этоксида в дозе 5 мг/кг массы тела. При использовании данной методики к концу эксперимента маркеры воспаления максимально приближались к нормальным показателям, что обусловлено действием препаратов на разные звенья патогенеза, реализуя при этом один и тот же эффект. Так, противовоспалительное действие нимесулида связано с подавлением синтеза простагландинов в очаге воспаления, вызывающих агрегацию тромбоцитов, отек и ноцицептивную сенсibilизацию, что является предрасполагающими факторами для развития процессов перекисного окисления липидов. В свою очередь, этоксидол, воздействуя на иммунокомпетентные клетки и обладая мембранопротекторной активностью, затрудняет доступ к остаткам жирных кислот активных форм кислорода, которые активно синтезируются под действием провоспалительных цитокинов.

Список литературы / References

1. Берглезов М.А., Андреева Т.М. Остеоартроз (этиология, патогенез) // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2006. № 4. С. 79-86. [Berglezov M.A., Andreeva T.M. Osteoarthritis (etiology, pathogenesis). *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova = N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics*, 2006, no. 4, pp. 79-86. (In Russ.)]
2. Дубровин Г.М., Блинков Ю.А., Нетяга С.В., Нетяга А.А. Обоснование применения миелопида для профилактики посттравматического остеоартроза (экспериментальное исследование) // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2005. № 2. С. 60-62. [Dubrovin G.M., Blinkov U.A., Netyaga S.V., Netyaga A.A. The rationale for the use of mielopid for the prevention of posttraumatic osteoarthritis (experimental study). *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova = N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics*, 2005, no. 2, pp. 60-62. (In Russ.)]
3. Есина Е.Ю. Новые подходы к терапии остеоартроза // ИнВестРегион, 2008. № 2. С. 48-50. [Esina E.Yu. New approaches to the treatment of osteoarthritis. *InVestRegion = Investigation*, 2008, no. 2, pp. 48-50. (In Russ.)]
4. Королева С.В., Львов С.Е., Григорьев Э.В., Мясоедова С.Е. Медикаментозное лечение остеоартроза // Травматология и ортопедия России, 2006. № 3. С. 76-81. [Koroleva S.V., Lvov S.E., Grigoriev E.V., Myasoedova S.E. Medical treatment of osteoarthritis (review of literature). *Travmatologiya i ortopediya Rossii = Traumatology and Orthopedics of Russia*, 2006, no. 3, pp. 76-81. (In Russ.)]
5. Миронов С.П., Ветрилэ С.Т., Космиади Г.А., Швеце В.В. Роль клеток иммунной системы в дегенеративных изменениях межпозвоночного диска // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, 2007. № 3. С. 16-22. [Mironov S.P., Vetrile S.T., Kosmiadi G.A., Shvets V.V. Role of immune cells in degenerative changes of the intervertebral disc. *Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova = N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics*, 2007, no. 3, pp. 16-22. (In Russ.)]
6. Фатеева Е.И., Скачилова С.Я., Митрохин Н.М. Липидрегулирующая активность нового оригинального производного 3-оксипиридина (этоксида) // Кубанский научный медицинский вестник,

2008. № 6 (105). С. 84-86. [Fateev E.I., Skahcilova S.J., Mitrokhin N.M. Operagoers activity new original derived 3-hydroхуридине (etoxazole). *Kubanskiy nauchnyy meditsinskiy vestnik = Kuban Research Medical Journal*, 2008, no. 6 (105), pp. 84-86. (In Russ.)]

7. Derry S., Loke Y.K. Risk of gastrointestinal haemorrhage with long term use of aspirin. *BMJ*, 2000, no. 321, pp. 1183-1187.

8. Hogue J.H., Mersfelder T.L. Pathophysiology and first-line treatment of osteoarthritis. *The Annals of Pharmacotherapy*, 2002, Vol. 36, no. 4, pp. 679-686.

9. Savage R. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors: when should they be used in the elderly. *Drugs Aging*, 2005, Vol. 22, no. 3, pp. 185-200.

Авторы:

Захватов А.Н. — к.м.н., доцент кафедры общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова с курсами оториноларингологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Козлов С.А. — д.м.н., профессор кафедры общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова с курсами оториноларингологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Аткина Н.А. — студентка 4 курса Медицинского института ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Дудоров И.И. — аспирант кафедры общей хирургии имени профессора Н.И. Атясова с курсами оториноларингологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет имени Н.П. Огарева», г. Саранск, Россия

Authors:

Zahvatov A.N., PhD (Medicine), Associate Professor, N.I. Atyasov Department of General Surgery with a Course of Otorhinolaryngology, Stomatology and Maxillofacial Surgery, N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Kozlov S.A., PhD, MD (Medicine), Professor, N.I. Atyasov Department of General Surgery with a Course of Otorhinolaryngology, Stomatology and Maxillofacial Surgery, N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Atkina N.A., Medical Student (4th acad. year), N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Dudorov I.I., Postdoc Fellow, N.I. Atyasov Department of General Surgery with a Course of Otorhinolaryngology, Stomatology and Maxillofacial Surgery, N.P. Ogarev State Medical University, Saransk, Russian Federation

Поступила 07.07.2015
Принята к печати 30.08.2015

Received 07.07.2015
Accepted 30.08.2015

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

Андропова Т.М.	15	Козлов В.А.	7	Сидорович И.Г.	51
Апарин П.Г.	51	Козлов И.Г.	15	Сизякина Л.П.	51
Аткина Н.А.	91	Козлов С.А.	91	Старостина Н.М.	63
Барбараш О.Л.	33	Коков Е.А.	15	Титов В.А.	41
Бердюгина О.В.	21	Колесникова Н.В.	15	Топорова В.А.	51
Бернс С.А.	33	Корнилова Г.В.	51	Трефилева Н.Ф.	51
Вафин И.А.	41	Коробова С.В.	51	Трубченинова Л.П.	51
Веремеев А.В.	33	Костянко М.В.	41	Хаитов Р.М.	51
Глушков А.Н.	41	Куртасова Л.М.	79	Черных Е.Р.	63
Гордеева Л.А.	41	Леплина О.Ю.	63	Шакина Н.А.	79
Гурьянова С.В.	15	Меледина И.В.	63	Шевела Е.Я.	63
Дудоров И.И.	91	Мун С.А.	41	Шипунов М.В.	63
Дьякова М.Е.	85	Николаева И.А.	51	Шмидт А.Р.	79
Ершова А.В.	21	Останин А.А.	63	Шмидт Е.А.	33
Журавлев В.Ю.	85	Перова Т.Л.	85	Эсмедяева Д.С.	85
Захватов А.Н.	91	Поленок Е.Г.	41		
Киприна Е.С.	33	Рагожина С.Е.	41		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аденозиндезаминаза	85	мультиплексный анализ	63
аллергические заболевания	15	мышь	52
антитела	41	нейтрализующие антитела	52
атопия	15	нимесулид	91
аутоиммунные реакции	7	острый коронарный синдром с элевацией ST и без подъема ST	33
бензо[а]пирен	41	патогенез	15
вакцина	52	пептиды	52
вирус Эпштейна-Барр	79	полиморфизмы генов	41
ВИЧ	52	посттравматический артрит	91
глюкозаминилмурамилдипептид (ГМДП)	15	пролиферация лимфоцитов	7
гомеостаз	7	рак легкого	41
гранулоциты	22	супероксид-анион	22
динамика цитокинов	33	туберкулез	85
интерферон	79	туберкулез легких	22
канцерогенез	41	усиление инфекции	52
клетки крови	63	фагоцитоз	22
клетки-супрессоры	7	цирроз печени	63
клеточная терапия	63	цитокины	63, 85, 91
клеточная чувствительность	79	этоксидол	91
костномозговые МНК и МСК	63	5'-нуклеотидаза	85
лейкоциты крови	79	CD26	85
молекулы адгезии	22	HLA-DR	22
моноклеары	85	IgE	15
моноциты	22		

KEDRION

БИОФАРМА

Keep Life Flowing

И.Г.Вена

ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНЫЙ
РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ

ВЫСОКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ВСЕМ НУЖНЫ



www.kedrion.com

ООО МЕДИПАЛ-ОНКО - официальный дистрибьютор
компании KEDRION S.p.A (Кедрион)
на территории Российской Федерации
www.medipal-onko.ru

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

