

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

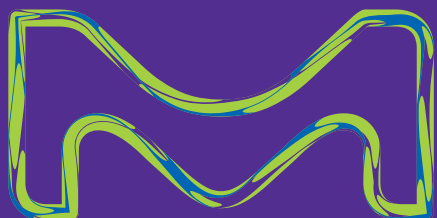
Том 18, № 2. С. 101-202

2016

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

откройте для себя мир проточной цитометрии с **guava® easyocyte**



- Возможность использования 12-ти параметров детекции
- Современное интуитивно-понятное программное обеспечение
- Простота работы и легкость обслуживания

НИКОГДА ЕЩЁ ПРОТОЧНАЯ
ЦИТОМЕТРИЯ НЕ БЫЛА
ТАКОЙ ДОСТУПНОЙ!

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35.
Тел./факс: +7 (495) 937-33-04/05
E-mail: mm.russia@merckgroup.com
merckmillipore.com/guava

MERCK

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

март-апрель

2016, том 18

№ 2

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 Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и 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, президент 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 Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spb.aaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Подписано в печать 28.03.2016 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 12,75. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1096

Напечатано в ООО «ИПК Береста».

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

Тел.: (812) 388-90-00

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

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

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

March-April

2016, volume 18

No. 2

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 Fundamental and 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, President, 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. Chukhlov, PhD, MD

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

Address for correspondence:

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

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

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

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

Federal Service for Supervision of Communications, 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, Malyye pers. Vasilevsky Island, 26, office 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 28.03.2016. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 12,75. 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 Fundamental and 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

Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Ширинский И.В.

КУЛЬТУРА ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИАЛЬНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ: СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ	107
--	-----

Оригинальные статьи

Ровда Ю.И., Шмулевич С.А., Шабалдин А.В., Лукоянычева Е.Б.

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ХЕЛПЕРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CD45RA- И CD31-МАРКЕРЫ, У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТИМЭКТОМИИ, ВЫПОЛНЕННОЙ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА СЕРДЦА.....	119
--	-----

Лосев И.В., Доница С.А., Петухова Г.Д., Ерофеева М.К., Руденко Л.Г., Найхин А.Н.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОЦЕНКИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОЙ СЕКРЕЦИИ АНТИТЕЛ В-ЛИМФОЦИТАМИ IN VITRO ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУНОГЕННОСТИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ РЕЗЕРВНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН А (H5N1) И А (H5N2)	129
---	-----

Цветкова В.Д., Сахарнов Н.А., Князев Д.И., Уткин О.В., Неумоина Н.В., Бруснигина Н.Ф.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК СПЛАЙСИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ DR3 В КРОВИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ	139
--	-----

Клинкова А.В., Кузьмина Е.Г., Абакушина Е.В., Каневский Л.М., Неприна Г.С., Павлов В.В., Коваленко Е.И.

ЦИРКУЛИРУЮЩИЙ БЕЛОК МІСА У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЛИМФОМАМИ	151
---	-----

Краткие сообщения

Свитич О.А., Омарова С.М., Алиева А.И., Рассказова Н.Д., Зверев В.В.

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ВНУТРИУТРОБНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ПЛОДА И ПНЕВМОНИИ НОВОРОЖДЕННЫХ.....	163
---	-----

Шкода О.С., Шилова А.Н., Козырева В.С., Черняевский А.М.

ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ЧРЕСКОЖНОЙ ТРАНСЛЮМИНАЛЬНОЙ КОРОНАРНОЙ АНГИОПЛАСТИКОЙ СО СТЕНТИРОВАНИЕМ.....	171
--	-----

Зорина В.Н., Исакова О.В., Зорина Р.М., Баженова Л.Г., Зорин Н.А.

КОНЦЕНТРАЦИИ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ И НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ ЖЕНЩИН ПРИ ПРИЕМЕ МЕНОПАУЗАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ.....	177
--	-----

Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н.

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ КОФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ Id2 ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ.....	183
--	-----

Сумеркина В.А., Телешева Л.Ф., Головнева Е.С., Квятковская С.В., Дворчик Е.Е.

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У МОЛОДЫХ МУЖЧИН С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ.....	187
---	-----

Дневник иммунолога.....	193
-------------------------	-----

Правила для авторов.....	199
--------------------------	-----

Авторский указатель	202
---------------------------	-----

Предметный указатель	202
----------------------------	-----

CONTENTS

Reviews

Schneider M.A., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

CULTURES OF FIBROBLAST-LIKE SYNOVIAL CELLS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: PROPERTIES AND OPPORTUNITIES	107
--	-----

Original articles

Rovda Yu.I., Shmulevich S.A., Shabaldin A.V., Lukoyanycheva E.B.

SUBPOPULATION PROFILES OF T HELPER CELLS EXPRESSING CD45RA AND CD31 MARKERS IN CHILDREN AFTER THYMECTOMY PERFORMED UPON SURGICAL TREATMENT OF CONGENITAL HEART DISEASE.....	119
---	-----

Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Erofeeva M.K., Rudenko L.G., Naykhin A.N.

APPLICATION OF METHOD BASED ON <i>IN VITRO</i> ANTIBODY QUANTIFICATION IN PBMC SUPERNATANT SAMPLES FOR IMMUNOGENICITY EVALUATION OF A (H5N1) AND A (H5N2) POTENTIALLY PANDEMIC INFLUENZA VACCINES IN CLINICAL TRIALS	129
--	-----

Cvetkova V.D., Sakharov N.A., Knyazev D.I., Utkin O.V., Neumoina N.V., Brusnigina N.F.

DETERMINATION OF LEVEL EXPRESSION OF mRNA SPLICING VARIANTS FOR DR3 IN BLOOD CELLS IN INFECTIOUS MONONUCLEOSIS	139
--	-----

Klinkova A.V., Kuzmina E.G., Abakushina E.V., Kanevskiy L.M., Neprina G.S., Pavlov V.V., Kovalenko E.I.

CIRCULATING MICA PROTEIN IN PATIENTS WITH MALIGNANT LYMPHOMAS	151
---	-----

Short communications

Svitich O.A., Omarova S.M., Alieva A.I., Rasskazova N.D., Zverev V.V.

MUCOSAL MICROFLORA AND INNATE IMMUNITY OF UPPER RESPIRATORY TRACT IN INTRAUTERINE FOETAL INFECTION AND PNEUMONIA OF NEONATES	163
--	-----

Shkoda O.S., Shilova A.N., Kozyreva V.S., Chernyavsky A.M.

EVALUATION OF MAIN INDEXES OF IMMUNE STATE IN THE PATIENTS WITH PERCUTANEOUS TRANSLUMINAL CORONARY ANGIOPLASTY WITH STENTING.....	171
---	-----

Zorina V.N., Isakova O.V., Zorina R.M., Bazhenova L.G., Zorin N.A.

CONCENTRATIONS OF IMMUNOREGULATORY PROTEINS AND SOME CYTOKINES IN BLOOD OF WOMEN DURING MENOPAUSAL THERAPY	177
--	-----

Mineev V.N., Nyoma M.A., Sorokina L.N.

A PATHOGENETIC ROLE OF TRANSCRIPTION COREPRESSOR Id2 IN BRONCHIAL ASTHMA	183
--	-----

Sumerkina V.A., Telesheva L.F., Golovneva E.S., Kvyatkovskaya S.V., Dvorchik E.E.

LYMPHOCYTE SUBPOPULATION PROFILE IN YOUNG MEN WITH METABOLIC SYNDROME	187
---	-----

Chronicle	193
-----------------	-----

Instructions to Authors	199
-------------------------------	-----

Author index	202
--------------------	-----

Subject index.....	202
--------------------	-----

КУЛЬТУРА ФИБРОБЛАСТОПОДОБНЫХ СИНОВИАЛЬНЫХ КЛЕТОК БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ: СВОЙСТВА И ВОЗМОЖНОСТИ

Шнайдер М.А., Ширинский В.С., Ширинский И.В.

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

Резюме. В обзоре представлены данные литературы о структуре синовиальной оболочки у здоровых людей и больных ревматоидным артритом *in vivo*, рассмотрены особенности фибробластоподобных синовиальных клеток больных ревматоидным артритом (РА) в культуре *in vitro*, включая морфологию, фенотип, функциональные свойства клеток культуры. Описан стандартный протокол культивирования ФСК *in vitro*. Подчеркивается, что ФСК характеризуются автономностью функционирования, способностью к инвазивному росту, способностью к миграции в различные, в том числе интактные, суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при ревматоидном артрите (РА). Особое внимание посвящено характеристике стабильного фенотипа фибробластоподобных синовиальных клеток как результату эпигенетических нарушений: изменениям метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, функции микроРНК. ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in vitro* тотальным гипометилированием ДНК. При РА ряд промоторов специфических генов (в частности CXCL12, IL-6), играющих существенную роль в патогенезе РА, находится в состоянии гипометилирования. В то же время в ФСК выявляются и гиперметилированные промоторы некоторых генов (гена рецептора смерти 3). Важным механизмом персистенции воспаления при РА является повышение ацетилирования гистонов в промоторах генов, ответственных за продукцию провоспалительных белков, в частности MMP1. Изменения в ацетилировании гистонов в ФСК связаны с высоким уровнем убиквитин-подобного белка SUMO-1 и параллельным снижением уровня специфической протеазы SENP1. Роль ацетилирования гистонов в патогенезе РА подтверждается эффективностью ингибитора деацетилазы гистонов трихостатина А при коллаген-индуцированном артрите у мышей. Содержание микроРНК-155 и микроРНК-146а стабильно повышено в культуре ФСК, так же как и в синовиальной ткани, синовиальной жидкости и МНК ПК пациентов с РА. Экспрессия микроРНК-124а снижена в ФСК от больных РА по сравнению с ОФСК. Экспрессия микроРНК-203 в ФСК также постоянно повышена. Уровень микроРНК-203 повышен в ФСК не только пациентов с многолетним РА по сравнению с остеоартритом и нормальными ФСК, а также у пациентов с ранним РА.

Адрес для переписки:

Шнайдер Мария Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630047, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (923) 107-51-00.
Факс: 8 (383) 228-25-47.
E-mail: minerva1986@mail.ru

Address for correspondence:

Schneider Maria A.
Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaia str., 14.
Phone: 7 (923) 107-51-00.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: minerva1986@mail.ru

Образец цитирования:

М.А. Шнайдер, В.С. Ширинский, И.В. Ширинский,
«Культура фибробластоподобных синовиальных
клеток больных ревматоидным артритом: свойства
и возможности» // Медицинская иммунология, 2016.
Т. 18, № 2. С. 107-118.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118

© Шнайдер М.А. и соавт., 2016

For citation:

M.A. Schneider, V.S. Shirinsky, I.V. Shirinsky, "Cultures of
fibroblast-like synovial cells from patients with rheumatoid
arthritis: properties and opportunities", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 2,
pp. 107-118.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-107-118

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-107-118>

Заключается, что фибробластоподобные синовиальные клетки являются ключевыми клеточными элементами, участвующими в патогенезе ревматоидного артрита, и исследования, посвященные нарушениям их эпигенетической регуляции, находятся в самом начале своего пути. Ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в этих процессах, являются потенциальными терапевтическими мишенями.

Ключевые слова: ревматоидный артрит, фибробластоподобные синовиальные клетки, фенотип, метилирование ДНК, ацетилирование гистонов, микроРНК

CULTURES OF FIBROBLAST-LIKE SYNOVIAL CELLS FROM PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS: PROPERTIES AND OPPORTUNITIES

Schneider M.A., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The present review contains data from literature concerning the *in vivo* structure of synovial membranes in healthy people and patients with rheumatoid arthritis (RA). The properties of *in vitro* cultured fibroblast-like synovial cells (FLS) from RA patients are considered, including FLS morphology, phenotype and function. A standard protocol of *in vitro* FLS culturing is described. Notably, the FLS are characterized by autonomic functioning, ability for invasive growth/migration, e.g., into non-affected joints. These FLS properties may be a reason of multiple joint involvement typical to RA. Special attention is drawn to characterization of stable phenotypic profile of FLS which results from certain epigenetic disturbances, i.e., changes of the DNA methylation, histone acetylation, and micro-RNA effects.

The FLS from RA patients are characterized with stable and extensive hypomethylation of genes which occurs *in vivo* and persists after repeated culture passages. Some promoters of genes involved into RA pathogenesis (for example, CXCL12, IL-6) are hypomethylated. By contrary, some other gene promoters (e.g., the death receptor 3 gene) are shown to be hypermethylated. An increased histone acetylation of genes encoding proinflammatory mediators (such as MMP1) may be an important mechanism of persistent inflammation in RA. Changes in histone acetylation in FLS are related to high levels of ubiquitin-like SUMO-1 protein and concurrent decrease in specific protease SENP1 activity. A role of histone acetylation in RA pathogenesis is supported by efficacy of a histone deacetylase inhibitor (Trichostatin A) in collagen-induced murine arthritis. Local concentrations of micro RNA-155, micro-RNA-146a, and micro-RNA-203 are permanently increased in FLS cultures, synovial tissues, and PBMC of the RA patients. Expression of micro RNA-124a is decreased in FLS from RA, as compared with OA FLS.

One may conclude that the fibroblast-like synovial cells are key cellular elements involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis, and the studies of their impaired epigenetic regulation are at their initial stage. Enzymes and molecular complexes involved in these processes may represent potential therapeutic targets for the treatment of RA.

Keywords: rheumatoid arthritis, fibroblast-like synovial cells, phenotype, DNA methylation, histone acetylation, microRNA

Введение

Хроническое воспаление при ревматоидном артрите (РА) в первую очередь затрагивает синовиальную оболочку сустава, претерпевающую в процессе развития болезни смену клеточного ансамбля и внеклеточных элементов. Сложная патоморфологическая структура синовиальной оболочки (СО) — результат динамического изменения содержания и функции существующих в норме клеток (синовиоциты типа А и В) и клеток, мигрирующих в подпокровный слой

СО (субпопуляции Т- и В-лимфоцитов, дендритные клетки, НК-клетки) [2]. Их появление и изменение активности скоординировано влиянием хемокинов, факторов роста, молекул адгезии, цитокинов. В содружестве с синовиоцитами клетки-мигранты реализуют воспаление в синовиальной, хрящевой и костной ткани самостоятельно на стадии «раннего РА», а также с помощью особой пролиферирующей ткани паннуса, который они формируют в стадии «позднего РА». Поэтому изучение морфологии клеток СО, их функциональных свойств, морфофункциональ-

ных характеристик внеклеточных элементов помогает расшифровать ключевые звенья патогенеза РА, выявить потенциальные терапевтические мишени для новых методов лечения. С этой целью уже в течение длительного времени используют три основных подхода [2]:

- изучение морфофункциональных свойств СО, полученной путем биопсии или при операции эндопротезирования;

- изучение функции клеток в краткосрочных культурах ткани биоптатов СО *in vitro*;

- изучение функциональных свойств синовиальных фибробластов в долгосрочных монослойных культурах *in vitro*.

Настоящее сообщение посвящено анализу данных литературы о морфологии, функциональных свойствах синовиальных фибробластов больных РА *in vitro*, возможности их использования в качестве клеток-мишеней для поиска новых лекарственных средств.

Структура синовиальной оболочки в норме

Под термином СО следует понимать весь лежащий внутри от фиброзной капсулы и ограничивающий полость сустава пласт соединительной ткани, состоящей из клеток и основного вещества, и содержащий кровеносные и лимфатические сосуды, нервные волокна и окончания [1]. Этот соединительнотканый пласт не покрыт эпителием и не имеет ограничительной базальной мембраны. Он выстилает все внутрисуставные структуры, кроме контактирующих между собой суставных хрящей. Покровный слой содержит примерно равные пропорции клеток двух различных типов: клетки типа А, или макрофагоподобные синовиальные клетки, и клетки типа В, или фибробластоподобные синовиальные клетки (ФСК) [35].

Последние ответственны за синтез внеклеточных матриксных белков, включая коллагены, фибронектин, гиалуроновую кислоту и другие молекулы, которые облегчают смазывание и скольжение поверхностей хряща [1]. Клетки типа А являются фагоцитирующими клетками и экспрессируют маркеры, характерные для клеток системы мононуклеарных фагоцитов (CD11b, CD68, CD14, CD163, MСН II) [7, 16]. При электронной микроскопии регистрируются пищеварительные вакуоли, указывающие на их фагоцитарную активность [52].

Синовиальная оболочка при ревматоидном артрите

Результатам изучения патоморфологии СО у больных РА посвящено большое количество оригинальных статей и обзоров [30], мы здесь ограничимся изложением лишь основополагающих данных.

В синовиальной оболочке при РА многократно повышается содержание резидентных клеток и клеток-мигрантов. Повышение количества синовиоцитов типа А и В увеличивает толщину покровного слоя, а иммунокомпетентные клетки (Т- и В-лимфоциты, дендритные клетки, плазмоциты, NK-клетки) распределяются в субсиновиальном слое диффузно или организуются в лимфоидные агрегаты [41, 91]. В инфильтратах преобладают CD4⁺Т-клетки, в основном представленные клетками памяти CD45RO⁺ и обладающие хемокиновыми рецепторами CXCR3 и CCR5, характерными для Th1-клеток. У 15–20% пациентов выявляются структуры, типичные для вторичных лимфоидных фолликулов [19, 84]. Следует отметить, что Т- и В-клеточные инфильтраты не специфичны для РА и встречаются при других хронических воспалительных заболеваниях суставов.

ФСК являются доминирующей популяцией клеток в гиперплазированной ревматоидной синовиоцитной и в месте инвазии синовиальной оболочки в хрящевую и костную ткань. ФСК представляют собой уникальный тип клеток, который отличает ревматоидный артрит от других воспалительных заболеваний суставов и СО здоровых людей [32]:

- Автономностью функционирования (для активации ФСК не обязательны экстраклеточные сигналы).

- Способностью к инвазивному росту, сохраняющемуся после ряда пассажей в культуре. Показано, что имплантация культивированных человеческих ФСК, совместно с клетками хрящевой ткани человека под почечную капсулу мышам с тяжелым комбинированным иммунодефицитом SCID (severe combined immunodeficiency), приводила к внедрению ФСК в имплантированный хрящ в течение двух месяцев. Внедрившиеся клетки экспрессировали молекулы адгезии, такие как VCAM-1, ICAM-1, интегрины, которые облегчали фиксацию к клеткам хряща, синтезировали металлопротеиназы, принимающие участие в разрушении внеклеточного матрикса хряща [57].

- Способностью к миграции в различные, в том числе интактные суставы, лежащей в основе полиартикулярного поражения при РА. Так, в одном исследовании хрящ здорового человека совместно с ФСК вводили подкожно SCID мышам [46]. На противоположной стороне имплантировали хрящ здорового человека без ФСК. Было установлено, что ФСК активно перемещаются к интактному хрящу через сосудистое русло, что сопровождается заметным разрушением хряща.

Активированные цитокинами ФСК являются главным источником провоспалительных медиаторов и металлопротеиназ при РА, при-

нимая участие в деструкции хрящевой и костной ткани, миграции и пролиферации в СО антигенпрезентирующих клеток, субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, нейтрофилов, НК-клеток, ангиогенезе. Кратко рассмотрим эти процессы.

В разрушении внеклеточного матрикса хряща участвуют различные ферменты, секретируемые в первую очередь ФСК: коллагеназы, желатиназы, агреканы, стромелизин; сериновые протеазы (трипсин, химотрипсин), катепсины, металлопротеиназы (ММР) [19]. В пораженном суставе присутствуют также ингибиторы протеаз, однако их активность подавляется массивным синтезом деградирующих ферментов [9, 28]. Таким образом, относительный баланс между уровнем протеаз и антипротеаз в СО больных РА нарушается и может быть стабилизирован приемом болезнь-модифицирующих препаратов [12, 88]. Если главными клетками-эффекторами деструкции матрикса хряща являются ФСК, хондроциты, нейтрофилы, то разрушение костной ткани происходит с участием в первую очередь остеокластов, которые накапливаются в субхондральном костном мозге и в зоне контакта паннуса и кости [10, 26, 71]. Резорбция кости осуществляется в субсистеме клеточных лиганд-рецепторных взаимодействий, в которых роль рецептора выполняет рецептор активатор NF-κB (RANK), экспрессирующийся остеокластами, а роль лиганда — RANKL [8, 83]. RANKL относится к семейству факторов некроза опухоли, экспрессируется на поверхности остеобластов, стромальных клеток костного мозга, ФСК, а также секретируется активированными Т-клетками при стимуляции провоспалительными цитокинами (TNF, IL-1, IL-17) [13, 73]. Антагонистом субсистемы RANK — RANKL является растворимый рецептор-«ловушка» остеопротегерин (OPG), который связывает RANKL [44, 90].

Провоспалительный потенциал СО больных РА обусловлен активностью макрофагов и ФСК, в меньшей степени субпопуляций Т- и В-лимфоцитов, являющихся источником синтеза разнообразных цитокинов [6, 21]. При этом следует отметить, что содержание «классических» цитокинов профиля Th1 и Th2 (IFN, IL-2 и IL-4, IL-10) в синовиальной оболочке больных РА невысокое [18, 34, 87]. В СО пораженных суставов определяют Т-клеточные цитокины, усиливающие дифференцировку Th1-лимфоцитов и поддерживающие воспаление (IL-12 и IL-17) [15, 74]. В синовиальной жидкости и ткани больных РА обнаруживают многочисленные провоспалительные цитокины (IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-16, IL-18, IL-32), GM-CSF и множество хемокинов, синтезируемых преимущественно активированными А-клетками и ФСК [75]. Цитокины уча-

ствуют в аутокринной и паракринной регуляции активности различных клеток, усиливая персистенцию воспаления в синовиальной оболочке, способствуя разрушению хряща и кости. Потенциально воспаление СО может быть лимитировано активностью противовоспалительных цитокинов (IL-10, TGF-β), действием растворимых рецепторов цитокинов, антител к цитокинам, однако их локальные концентрации ниже необходимых для подавления воспаления [75].

Важная роль в формировании паннуса у больных РА принадлежит нарушениям механизмов апоптоза. Физиологической гиперплазии ткани и пролиферации клеток в процессе иммунного ответа обычно противодействует запрограммированная смерть клеток, или апоптоз, предотвращающий избыточное накопление клеточных популяций. Однако в гиперплазированной СО больных РА присутствует относительно немного клеток в состоянии апоптоза, несмотря на наличие таких мощных стимулов смерти клетки, как гипоксия и TNFα. Происходит активное подавление апоптоза, обусловленное избытком антиапоптотических молекул, которые вырабатываются ФСК [7, 42, 66]. Напомним, что существуют два основных пути апоптоза в клетке: митохондриальный и путь через рецепторы апоптоза [27, 50].

Bcl-2 регулирует клеточную смерть, контролируя проницаемость митохондриальной мембраны. Bcl-2 в значительном количестве экспрессируется в синовиальной оболочке больных РА [54, 69]. IL-15 — цитокин с плейотропным действием на клетки врожденного и адаптивного иммунитета, увеличивает уровни экспрессии мРНК Bcl-2 и Bcl-XL. Блокада IL-15 увеличивает апоптоз в ФСК и одновременно подавляет экспрессию Bcl-2 [42, 43]. Bcl-2 оказывает антиапоптотический эффект на уровне митохондрий, тем самым способствуя пролиферативным процессам в синовиальной оболочке у больных РА.

Обсуждается нарушение апоптоза синовиоцитов у больных РА, связанное с геном супрессором опухолей p53 [3, 80, 89]. Продукт p53 гена ответственен за целостность генома, участвуя в репарации ДНК, делении клеток, и клеточную смерть. В клетках ревматоидной синовиальной оболочки экспрессия p53 повышена, вероятно, вследствие разрушительного влияния генотоксических факторов микросреды воспаленного сустава на ДНК [22].

Культуры ФСК больных РА *in vitro*, их свойства не являются той моделью, которая полностью отражает всю сложность клеточных взаимодействий в СО больных РА. Об этих ограничениях всегда следует помнить, используя культуры ФСК для решения тех или иных задач.

Особенности фибробластоподобных синовиальных клеток больных РА в культуре *in vitro*

Использование ФСК вне организма для изучения патогенеза ревматоидного артрита является логическим продолжением метода биопсии, при котором изъятый из организма фрагмент ткани подвергается немедленному, преимущественно морфологическому, исследованию. Благодаря длительному культивированию возможности исследования расширяются практически беспредельно, так как становится реальной оценка не только морфологических и биохимических изменений, но и изменений в поведении клеток, их реакций на различные агенты, в том числе на воздействия лекарств.

Преимущества изучения фибробластоподобных синовиоцитов *in vitro*:

1. Они сохраняют важнейшие черты, свойственные этим клеткам в организме; более того, они сохраняют онтогенетические индивидуально-генотипические свойства организма-донора.

2. Изучение культивированных *in vitro* ФСК дает возможность понять механизмы сигнальной трансдукции, выделения медиаторов, пролиферации и апоптоза [72].

3. Изменения, которые претерпевают ФСК в культуре *ex vivo*, легко контролируются путем создания соответствующих условий.

Для получения культур ФСК используют СО, полученную в ходе операций по замене суставов (коленного или тазобедренного), синовэктомии или синовиальной биопсии. Метод культивирования ФСК отработан достаточно давно, со временем претерпел ряд модификаций и на сегодняшний день является стандартным [74, 92].

Представим кратко этапы культивирования:

— ткань, полученную из синовиальной оболочки коленного или тазобедренного сустава больных РА во время операции, помещают в контейнер с закручивающейся крышкой при $t +4^{\circ}\text{C}$;

— заранее готовят раствор трипсина с PBS и раствор коллагеназы Р в среде DMEM, содержащей FCS;

— ткань промывают холодным PBS и помещают в 150-мм чашку Петри, чтобы удалить нежелательные ткани — жировую и т. д.;

— перемещают ткань в чистую 150-мм чашку Петри и нарезают кусочками;

— образцы ткани переносят в колбу, содержащую раствор трипсина и PBS. Инкубируют при 37°C в течение 30 мин, после инкубации удаляют супернатант;

— к оставшейся в колбе ткани добавляют раствор коллагеназы Р с DMEM, содержащей FCS, и продолжают инкубацию в течение 2 ч при 37°C и $5\% \text{CO}_2$;

— пипетируют смесь через клеточный фильтр в пробирку объемом 50 мл, клеточную взвесь центрифугируют при 250 g 10 мин. Затем удаляют супернатант, взвесь клеток размешивают, промывают добавлением 15 мл DMEM и вновь центрифугируют. Количество жизнеспособных клеток подсчитывают с помощью трипанового синего;

— ресуспензируют взвесь в среднем 1×10^6 клеток в 15 мл DMEM, добавляют взвесь в Т-75 флакон, содержащий 5 мл DMEM, инкубируют при 37°C и $5\% \text{CO}_2$ до образования монослоя.

Морфология, фенотип, функциональные свойства культуры ФСК

При световой микроскопии ФСК в культуре представляют собой удлинённые, иногда овальные или полигональные клетки, с небольшим количеством цитоплазматических отростков, хорошо выраженным ядром (см. рис. 1 и 2, см. 3-ю стр. обложки).

Редко клетки имеют древовидную или звездчатую форму. При электронной микроскопии ФСК содержат большое количество эндоплазматического ретикула, отсутствуют пищеварительные вакуоли [72].

Гетерогенная природа ФСК в культуре усложняет определение точного фенотипа. Его идентифицируют по наличию типичной морфологии и ультраструктуры, отсутствия большого количества гранулярного эндоплазматического ретикула, макрофагальных маркёров, таких как CD14 и CD68, а также неспособностью поглощать частички латекса [11]. ФСК являются мезенхимальными клетками, которые обладают признаками фибробластов, включая экспрессию виментина и CD90 (Thy-1), а также продукцию IV и V типов коллагена [19, 20]. Но помимо этого ФСК обладают рядом уникальных свойств *in situ*, которые отличают их от многих других клеточных линий фибробластов. Относительно специфическими маркерами ФСК являются васкулярно клеточные адгезивные молекулы (VCAM-1) [56], CD55 (белковый регулятор C3/C5-конвертазы) [29], а также уридин дифосфоглюкозо-дегидрогеназа (UDPGD) [70]. Специфической адгезивной молекулой, экспрессируемой ФСК, является кадгерин-11, отвечающий за формирование синовиальной выстилки и способствующий разрушению хряща, хотя точный механизм до конца остается неясным [45, 85].

ФСК пролиферируют в культуре прилипших клеток, и скорость пролиферации увеличивается под действием фактора роста тромбоцитов (PDGF), трансформирующего ростового фактора (TGF- β). Умеренный пролиферативный эффект наблюдается также после воздействия TNF α и IL-1 β [5]. Эти цитокины усиливают синтез ФСК простагландина E2 [14, 53], продукцию

IL-6, IL-8, GM-CSF, матричных металлопротеиназ MMP-1, MMP-3 [4], экспрессию молекул адгезии, а именно VCAM-1, ICAM-1, интегринов [19, 20].

Стабильный фенотип ФСК как результат эпигенетических нарушений

В последние годы все большее внимание исследователей привлекают эпигенетические механизмы регуляции активности генов, в том числе при мультифакториальных заболеваниях, к числу которых относится и РА. Этот интерес обусловлен, прежде всего, перспективой открытия новых терапевтических мишеней.

Предполагается, что в основе стабильно измененного фенотипа ФСК лежат эпигенетические изменения [67], в частности нарушения метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК [81].

Роль метилирования ДНК в изменениях фенотипа ФСК

Метилирование ДНК — эпигенетический механизм экспрессии генов, не затрагивающий последовательность ДНК [81].

ДНК-метилтрансферазы (DNA methyltransferases, DNMTs) являются «эффекторами» метилирования ДНК и катализируют либо метилирование *de novo* (т.е. в новых сайтах), либо поддерживают метилирование полуметилированной ДНК после репликации ДНК. Утрата способности поддерживать метилирование ДНК или дерегуляция в уровнях метилирования ДНК может приводить к различным заболеваниям [81].

Так, показано, что ФСК больных РА характеризуются стабильным, возникающим *in vivo* и сохраняющимся после неоднократных пассажей *in vitro* тотальным гипометилированием ДНК, сопоставимым по выраженности с гипометилированием ДНК в опухолевых клетках [38].

В исследовании Neidhart и его коллег была продемонстрирована повышенная экспрессия ретротранспозонов LINE-1 (длинных диспергированных нуклеотидных элементов — 1) в клетках синовиальной оболочки больных РА, особенно в местах инвазии [63]. Ретротранспозоны — это мобильные последовательности ДНК, которые могут перемещаться внутри генома и при этом подавлять метилирование ДНК. Экспрессия LINE-1 элементов в ФСК индуцирует транскрипцию р38, галектин-3-связывающего белка и met протоонкогена, демонстрируя, что наличие функциональной LINE-1 может вызывать изменения в экспрессии генов [63]. Гипотеза, что экспрессия LINE-1 в ФСК связана с потерей метилированных меток, была подтверждена исследованиями, показавшими, что геномная ДНК ФСК от больных РА была глобально гипо-

метилирована по сравнению с ФСК при остеоартрите (ОФСК) или ФСК здоровых пациентов [38]. При этом в ОФСК уровень DNMT1 увеличивался в процессе пролиферации, обеспечивая тем самым полноценное восстановление метилирования в недавно синтезированной цепи ДНК, тогда как пролиферирующие ФСК больных РА характеризуются относительным недостатком DNMT1. Этот недостаток DNMT1 может привести к утрате метилирования в дочерних клетках, что с течением времени способствует прогрессивному преобразованию фенотипа ФСК в клетку с высоким провоспалительным потенциалом.

В настоящее время показано, что ряд промоторов специфических генов, играющих существенную роль в патогенезе РА, находится в состоянии гипометилирования. Продемонстрирована конститутивно повышенная экспрессия CXCL12 в РФСК за счет гипометилирования его промоторной области [39]. Высокие уровни CXCL12, в свою очередь, стимулируют выработку металлопротеиназ, ферментов, которые частично могут отвечать за деструктивное действие ФСК. Было показано, что у пациентов с РА, получавших блокаторы TNF α , уровень CXCL12 оставался высоким и активность болезни сохранялась, в то время как после синовэктомии уровень CXCL12 значительно снижался [37, 86]. Последние публикации показали, что деметилирование даже одного CpG-мотива в промоторах генов IL-6 [33, 64] и IL-10 [23, 49] коррелирует с их уровнем экспрессии и, следовательно, способствует увеличению уровня цитокинов во время болезни.

В то же время в ФСК выявляются и гиперметилированные промоторы некоторых генов. Специфические CpG-островки в промоторе гена рецептора смерти 3 (DR3) находились в состоянии гиперметилирования, обеспечивая устойчивость синовиальных клеток к апоптозу при РА [82].

Роль модификаций гистонов в стабильно измененном фенотипе ФСК

Ацетилирование и метилирование коровых гистонов, особенно H3 и H4, были одними из первых описанных ковалентных модификаций этих белков. Со временем были идентифицированы и охарактеризованы другие типы ковалентных модификаций гистонов, в их числе: фосфорилирование, убиквитинирование, сумоилирование, АДФ-рибозилирование, биотинилирование, изомеризация пролина. Все эти модификации происходят в различных сайтах и остатках гистонов и вместе составляют сложный гистоновый код, который способствует подавлению или активации транскрипции соответствующих белков [79]. Степень ацетилирования гистонов определяется активностью двух типов ферментов —

гистонацетилтрансфераз (НАТ) и гистондеацетилаз (HDAC) [78].

Изменение секреции и активности гистондеацетилаз может негативно регулировать доступность промотора гена. В одном исследовании было продемонстрировано уменьшение активности HDAC в синовиальной ткани больных РА по сравнению с синовиальной тканью больных ОА и снижением уровня HDAC1 и HDAC2 [31]. В другой работе [40] показано, что активность HDAC выше в синовиальной ткани больных РА, чем у пациентов с ОА, причем содержание HDAC1 было увеличено [40]. Не ясно, преобладают ли процессы глобального гипер- или гипoaцетилирования в ФСК больных РА, но иммуногистохимический анализ с использованием меченых антител против ацетил-лизина показал значительное ацетилирование в макрофагах и ФСК синовиальной ткани больных РА [25].

Важным механизмом персистенции воспаления при РА является повышение ацетилирования гистонов в промоторах генов, ответственных за продукцию провоспалительных белков. Так, показано, что участок промотора MMP1 ФСК больных РА находится в гиперацетилированном состоянии [51]. Продemonстрировано, что стимуляция ФСК TNF α и IL-1 β индуцирует ацетилирование промотора регулятора клеточного цикла — p21, что, в свою очередь, коррелирует с пролиферацией ФСК [65]. Обнаружено, что изменения в ацетилировании гистонов в ФСК связаны с высоким уровнем убиквитин-подобного белка SUMO-1 и параллельным снижением уровня специфической протеазы SENP1. При гиперсекреции SENP1 в ФСК ацетилирование гистона H4 в промоторе MMP1 было снижено, что приводило к уменьшению инвазивности ФСК [51]. Поскольку этот эффект зависит от экспрессии HDAC4, авторы предположили, что увеличение сумоилирования HDAC4 в ФСК предотвращает его ядерную транслокацию и последующее деацетилирование гистонов в промоторе MMP-1.

Складывается впечатление, что вмешательства, направленные на снижение функции HDAC ФСК, обладают терапевтическим потенциалом при РА. Показано, что введение различных ингибиторов HDAC приводит к профилактическому и лечебному эффекту на моделях артрита у животных [48, 60, 65]. Jungel и его коллеги [36] добавляли в культуры ФСК ингибитор гистондеацетилазы — трихостатин А (TSA), что способствовало подавлению их пролиферации и сенсibilизации к TRAIL — цитокину семейства фактора некроза опухоли, выполняющего роль лиганда, вызывающего апоптоз. Впоследствии Nasu и его коллеги

[62] провели исследование *in vivo*, где были проанализированы эффекты TSA при лечении артрита, индуцированного антителом против коллагена (CAIA) у мышей. Мыши получали подкожные инъекции TSA, и гистологический анализ показал дозозависимое улучшение морфологических проявлений артрита. Кроме того, введение ингибиторов HDAC в культуры *in vitro* макрофагов и синовиальных эксплантатов от больных РА выявило их мощное противовоспалительное действие [24]. Механизмы, посредством которых HDAC оказывают противовоспалительное действие, полностью не понятны. Предполагается, что противовоспалительный эффект возникает вследствие увеличения ацетилирования гистонов в промоторах транскрипционных репрессоров, повышения транскрипции продуктов генов, обладающих противовоспалительными свойствами или модификации негистоновых белков [55]. Эти, пока немногочисленные, исследования свидетельствуют о том, что методы лечения, основанные на модуляции HDAC, могут стать реальностью для лечения ревматоидного артрита.

Роль микроРНК в стабильном фенотипе ФСК

Подавление экспрессии гена может быть вызвано не только репрессорами белковой природы, и не всегда на уровне транскрипции. Супрессирующим экспрессию белков на посттранскрипционной стадии обладают микроРНК — небольшие (от 19 до 22 нуклеотидов), эндогенные, одноцепочечные, не кодирующие РНК [47]. Показано, что экспрессия нескольких микроРНК в ФСК была изменена, и это способствовало изменению уровня пролиферации, продукции провоспалительных цитокинов и MMP [59, 76]. Содержание микроРНК-155 и микроРНК-146а стабильно повышено в культуре ФСК, так же как и в синовиальной ткани, синовиальной жидкости и МНК ПК пациентов с РА [58, 61, 68, 77], в то время как экспрессия микроРНК-124а снижена в ФСК от больных РА по сравнению с ОФСК [59]. Экспрессия микроРНК-203 в ФСК также постоянно повышена, и ее высокий уровень способствует продукции IL-6 и MMP в этих клетках [76]. Необходимо отметить, что уровень микроРНК-203 повышен в ФСК не только пациентов с многолетним РА по сравнению с остеоартритом и нормальными ФСК, а также у пациентов с ранним РА. Предполагается, что на ранних этапах болезни эпигенетическая регуляция сбалансирована, что позволяет ФСК оставаться пластичными [76].

Механизмы эпигенетической регуляции ФСК тесно взаимосвязаны. Так, показано, что деметилирование нормальных синовиальных фибробластов с помощью 5-азациитидина приводит

к повышенной экспрессии микроРНК-203 [17]. Пока не ясно, как координируются процессы нарушения метилирования ДНК, ацетилирования гистонов, активности малых РНК, обеспечивая стабильность фенотипа ФСК, их провоспалительный потенциал.

Заключение

ФСК являются ключевыми клеточными элементами, участвующими в патогенезе ревматоидного артрита. Эпигенетические изменения потенциально уже могут объяснить некоторые ключевые особенности стабильно измененного

фенотипа ФСК при РА. Большинство приобретенных эпигенетических нарушений — обратимые процессы, регулируемые специфическими ферментами и кофакторами, которые позволяют клеткам изменять экспрессию генов в ответ на различные раздражители. Ферменты и молекулярные комплексы, участвующие в этих процессах, являются потенциальными терапевтическими мишенями.

Исследования, посвященные нарушениям их эпигенетической регуляции ФСК при РА, находятся в самом начале своего пути. Есть основания полагать, что на этом трудном пути нас ждет больше радости, чем разочарования.

Список литературы / References

1. Павлова В.Н. Синовиальная среда суставов. М.: Медицина, 1980. 294 с. [Pavlova V. N. Synovial fluid of joints]. Moscow: Meditsina, 1980. 294 p.
2. Раденска-Лоповок С.Г. Биопсия синовиальной оболочки как метод оценки эффективности терапии ревматоидного артрита: подход к стандартизации клинических испытаний // Современная ревматология, 2011. №4. С. 31-34. [Radenska-Lopovok S.G. Synovial membrane biopsy as a method for evaluating the efficiency of therapy for rheumatoid arthritis: approach to standardizing clinical trials. *Sovremennaya revmatologiya = Modern Rheumatology*, 2011, no. 4, pp. 31-34. (In Russ.)]
3. Чумаков П.М. Белок p53 и его универсальные функции в многоклеточном организме // Успехи биологической химии, 2007. Т. 47. С. 3-52. [Chumakov P. M. Versatile Functions of p53 protein in multicellular Organisms. *Uspekhi biologicheskoy khimii = Advances Biological Chemistry*, 2007, Vol. 47, pp. 3-52. (In Russ.)]
4. Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Brown C.B., Kaushansky K., Firestein G.S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. VI. Analysis of the synovial cells involved in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor production and gene expression in rheumatoid arthritis and its regulation by IL-1 and tumor necrosis factor- α . *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 10, pp. 3365-3371.
5. Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Cytokines in chronic inflammatory arthritis. V. Mutual antagonism between interferon- γ and tumor necrosis factor- α on HLA-DR expression, proliferation, collagenase production, and granulocyte macrophage colony-stimulating factor production by rheumatoid arthritis synoviocytes. *J. Clin. Invest.*, 1990, Vol. 86, no. 6, pp. 1790-1798.
6. Arend W.P., Dayer J.M. Cytokines and cytokine inhibitors or antagonists in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1990, Vol. 33, pp. 305-315.
7. Bartok B., Firestein G.S. Fibroblast-like synoviocytes: key effector cells in rheumatoid arthritis. *Immunol. Rev.*, 2010, Vol. 233, no. 1, pp. 233-255.
8. Boyle W.J., Simonet W.S., Lacey D.L. Osteoclast differentiation and activation. *Nature*, 2003, Vol. 423, pp. 337-342.
9. Brackertz D., Hagmann J., Kueppers F. Proteinase inhibitors in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 1975, Vol. 34, pp. 225-230.
10. Bromley M., Woolley D.E. Chondrocytes and osteoclasts at subchondral sites of erosions in the rheumatoid joint. *Arthritis Rheum.*, 1984, Vol. 27, pp. 968-975.
11. Burmester G.R., Jahn B., Rohwer P., Zacher J., Winchester R.J., Kalden J.R. Differential expression of Ia antigens by rheumatoid synovial lining cells. *J. Clin. Invest.*, 1987, Vol. 80, pp. 595-604.
12. Close D.R. Matrix metalloproteinase inhibitors in rheumatic diseases. *Ann. Rheum. Dis.*, 2001, Vol. 60, pp. iii62-iii67.
13. Collin-Osdoby P., Rothe L., Anderson F., Nelson M., Maloney W., Osdoby P. Receptor activator of NF- κ B and osteoprotegerin expression by human microvascular endothelial cells, regulation by inflammatory cytokines, and role in human osteoclastogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2001, Vol. 276, pp. 20659-20672.
14. Dayer J.M., Beutler B., Cerami A. Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E2 production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.*, 1985, Vol. 162, pp. 2163-2168.
15. Dolhain R.J., van der Heiden A.N., ter Haar N.T., Breedveld F.C., Miltenburg A.M. Shift toward T lymphocytes with a T helper 1 cytokine-secretion profile in the joints of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, no. 12, pp. 1961-1969.
16. Edwards J.C., Willoughby D.A. Demonstration of bone marrow derived cells in synovial lining by means of giant intracellular granules as genetic markers. *Ann. Rheum. Dis.*, 1982, Vol. 41, pp. 177-182.

17. Feldges Stanczyk J., Karouzakis E., Jungel A., Ospelt C., Kolling C., Michel Beat A., Gay R.E. Mir-203 Regulates the Expression of IL-6 and Matrix Metalloproteinase(MMP)-1 in RA Synovial Fibroblasts [abstract]. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, 1893 p.
18. Feldmann M., Brennan F.M., Maini R.N. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu. Rev. Immunol.*, 1996, Vol. 14, pp. 397-440.
19. Firestein G.S. Etiology and pathogenesis of rheumatoid arthritis. In: Firestein G.S., Budd R.C., Harris T., McInnes I.B., Ruddy S., Sargent J.S., editors. *Kelly's Textbook of Rheumatology. 8. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier*, 2009, pp. 1035-1086.
20. Firestein G.S., Gary S. Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors? *Arthritis Rheum.*, 1996, Vol. 39, pp. 1781-1790.
21. Firestein G.S., Alvaro-Garcia J.S., Maki R. Quantitative analysis of cytokine gene expression in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.*, 1990, Vol. 144, pp. 3347-3353.
22. Firestein G.S., Nguyen K., Aupperle K.R., Yeo M., Boyle D.L., Zvaifler N.J. Apoptosis in rheumatoid arthritis: p53 overexpression in rheumatoid arthritis synovium. *Am. J. Pathol.*, 1996, Vol. 149, pp. 2143-2151.
23. Fu L.H., Ma C.L., Cong B., Li S.J., Chen H.Y., Zhang J.G. Hypomethylation of proximal CpG motif of interleukin-10 promoter regulates its expression in human rheumatoid arthritis. *Acta. Pharmacol. Sin.*, 2011, Vol. 32, pp. 1373-1380.
24. Grabiec A.M., Krausz S., de Jager W., Burakowski T., Groot D., Sanders M.E., Prakken B.J., Maslinski W., Eldering E., Tak P.P., Reedquist K.A. Histone deacetylase inhibitors suppress inflammatory activation of rheumatoid arthritis patient synovial macrophages and tissue. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, pp. 2718-2728.
25. Grabiec A.M., Tak P.P., Reedquist K.A. Targeting histone deacetylase activity in rheumatoid arthritis and asthma as prototypes of inflammatory disease: should we keep our HATs on? *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, p. 226.
26. Gravallesse E.M., Manning C., Tsay A., Naito A., Pan C., Amento E., Goldring S.R. Synovial tissue in rheumatoid arthritis is a source of osteoclast differentiation factor. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, pp. 250-258.
27. Green D.R., Knight R.A., Melino G., Finazzi-Agro A., Orrenius S. Ten years of publication in cell death. *Cell Death Differ.*, 2004, Vol. 11, pp. 2-3.
28. Hadler N.M., Johnson A.M., Spitznagel J.K., Quinet R.J. Protease inhibitors in inflammatory synovial effusions. *Ann. Rheum. Dis.*, 1981, Vol. 40, pp. 55-59.
29. Hamann J., Wishaupt J.O., van Lier R.A., Smeets T.J., Breedveld F.C., Tak P.P. Expression of the activation antigen CD97 and its ligand CD55 in rheumatoid synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 1999, Vol. 42, pp. 650-658.
30. Hitchon C.A., El-Gabalawy H.S. The synovium in rheumatoid arthritis. *Open Rheumatol. J.*, 2011, Vol. 5, pp. 107-114.
31. Huber L.C., Brock M., Hemmatazad H., Giger O.T., Moritz F., Trenkmann M., Distler J.H. W., Gay R.E., Kolling C., Moch H., Michel B.A., Gay S., Distler O., Jungel A. Histone deacetylase/acetylase activity in total synovial tissue derived from rheumatoid arthritis and osteoarthritis patients. *Arthritis Rheum.*, 2007, Vol. 56, pp. 1087-1093.
32. Huber L.C., Distler O., Tarner I., Gay R.E., Gay S., Pap T. Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology. Oxford*, 2006, Vol. 45, pp. 669-675.
33. Ishida K., Kobayashi T., Ito S., Komatsu Y., Yokoyama T., Okada M., Abe A., Murasawa A., Yoshie H. Interleukin-6 gene promoter methylation in rheumatoid arthritis and chronic periodontitis. *J. Periodontol.*, 2012, Vol. 83, pp. 917-925.
34. Isomaki P., Punnonen J. Pro- and anti-inflammatory cytokines in rheumatoid arthritis. *Ann. Med.*, 1997, Vol. 29, pp. 499-507.
35. Iwanaga T., Shikichi M., Kitamura H., Yanase H., Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch. Histol. Cytol.*, 2000, Vol. 63, no. 1, pp. 17-31.
36. Jungel A., Baresova V., Ospelt C., Simmen B.R., Michel B.A., Gay R.E., Gay S., Seemayer C.A., Neidhart M. Trichostatin A sensitises rheumatoid arthritis synovial fibroblasts for TRAIL-induced apoptosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2006, Vol. 65, pp. 910-912.
37. Kanbe K., Takemura T., Takeuchi K., Chen Q., Takagishi K., Inoue K. Synovectomy reduces stromal-cell-derived factor-1 (SDF-1) which is involved in the destruction of cartilage in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *J. Bone Joint. Surg. Br.*, 2004, Vol. 86, pp. 296-300.
38. Karouzakis E., Gay R.E., Michel B.A., Gay S., Neidhart M. DNA hypomethylation in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, pp. 3613-3622.
39. Karouzakis E., Rengel Y., Jungel A., Kolling C., Gay R.E., Michel B.A., Tak P.P., Gay S., Neidhart M., Ospelt C. DNA methylation regulates the expression of CXCL12 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts. *Genes Immun.*, 2011, Vol. 12, pp. 643-652.
40. Kawabata T., Nishida K., Takasugi K., Ogawa H., Sada K., Kadota Y., Inagaki J., Hirohata S., Ninomiya Y., Makino H. Increased activity and expression of histone deacetylase 1 in relation to tumor necrosis factor-alpha in synovial tissue of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, R133.
41. Kobayashi I., Ziff M. Electron microscopic studies of lymphoid cells in the rheumatoid synovial membrane. *Arthritis Rheum.*, 1973, Vol. 16, pp. 471-486.
42. Korb A., Pavenstädt H., Pap T. Cell death in rheumatoid arthritis. *Apoptosis*, 2009, Vol. 14, no. 4, pp. 447-454.

43. Kurowska M., Rudnicka W., Kontny E., Janicka I., Chorzasty M., Kowalczyński J., Ziółkowska M., Ferrarilacraz S., Strom T.B., Maśliński W. Fibroblast-like synoviocytes from rheumatoid arthritis patients express functional IL-15 receptor complex: endogenous IL-15 in autocrine fashion enhances cell proliferation and expression of Bcl-x(L) and Bcl-2. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, pp. 1760-1767.
44. Lacey D.L., Timms E., Tan H.-L., Kelley M.J., Dunstan C.R., Burgess T., Elliot R., Colombero A., Elliot G., Scully S., Hsu H., Sullivan J., Hawkins N., Davy E., Capparelli C., Eli A., Qian Y.X., Kaufman S., Sarosi I., Shalhoub V., Senaldi G., Guo J., Delaney J., Boyle W.J. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell*, 1998, Vol. 93, pp. 165-176.
45. Lee D.M., Kiener H.P., Agarwal S.K., Noss E.H., Watts G.F., Chisaka O., Takeichi M., Brenner M.B. Cadherin-11 in synovial lining formation and pathology in arthritis. *Science*, 2007, Vol. 315, pp. 1006-1010.
46. Lefèvre S., Knedla A., Tennie C., Kampmann A., Wunrau C., Dinser R., Korb A., Schnäker E.M., Tarner I.H., Robbins P.D., Evans C.H., Stürz H., Steinmeyer J., Gay S., Schölmerich J., Pap T., Müller-Ladner U., Neumann E. Synovial fibroblasts spread rheumatoid arthritis to unaffected joints. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 12, pp. 1414-1420.
47. Lewis B.P., Shih I.H., Jones-Rhoades M.W., Bartel D.P., Burge C.B. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 2003, Vol. 115, pp. 787-798.
48. Lin H.S., Hu C.Y., Chan H.Y., Liew Y.Y., Huang H.P., Lepescheux L., Bastianelli E., Baron R., Rawadi G., Clément-Lacroix P. Anti-rheumatic activities of histone deacetylase (HDAC) inhibitors *in vivo* in collagen-induced arthritis in rodents. *Br. J. Pharmacol.*, 2007, Vol. 150, pp. 862-872.
49. Lin S.Y., Hsieh S.C., Lin Y.C., Lee C.N., Tsai M.H., Lai L.C., Chuang E.Y., Chen P.C., Hung C.C., Chen L.Y., Hsieh W.S., Niu D.M., Su Y.N., Ho H.N. A whole genome methylation analysis of systemic lupus erythematosus: hypomethylation of the IL10 and IL1R2 promoters is associated with disease activity. *Genes Immun.*, 2012, Vol. 13, pp. 214-220.
50. Liu H., Pope R.M. Apoptosis in rheumatoid arthritis: friend or foe. *Rheum. Dis. Clin. North Am.*, 2004, Vol. 30, pp. 603-625.
51. Maciejewska-Rodrigues H., Karouzakis E., Strietholt S., Hemmatzad H., Neidhart M., Ospelt C., Gay R.E., Michel B.A., Pap T., Gay S., Jüngel A. Epigenetics and rheumatoid arthritis: the role of SENP1 in the regulation of MMP-1 expression. *J. Autoimmun.*, 2010, Vol. 35, pp. 15-22.
52. Mapp P.I., Revell P.A. Ultrastructural characterisation of macrophages (type A cells) in the synovial lining. *Rheumatol. Int.*, 1988, Vol. 8, no. 4, pp. 171-176.
53. Martel-Pelletier J., Pelletier J.P., Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2003, Vol. 33, no. 3, pp. 155-167.
54. Matsumoto S., Müller-Ladner U., Gay R.E., Nishioka K., Gay S. Ultrastructural demonstration of apoptosis, Fas and Bcl-2 expression of rheumatoid synovial fibroblasts. *J. Rheumatol.*, 1996, Vol. 23, pp. 1345-1352.
55. Mitsiades C.S., Mitsiades N.S., McMullan C.J., Poulaki V., Shringarpure R., Hideshima T., Akiyama M., Chauhan D., Munshi N., Gu X., Bailey C., Joseph M., Libermann T.A., Richon V.M., Marks P.A., Anderson K.C. Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2004, Vol. 101, pp. 540-545.
56. Morales-Ducet J., Wayner E., Elices M.J., Alvaro-Gracia J.M., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Alpha 4/beta 1 integrin (VLA-4) ligands in arthritis. Vascular cell adhesion molecule-1 expression in synovium and on fibroblast-like synoviocytes. *J. Immunol.*, 1992, Vol. 149, no. 4, pp. 1424-1431.
57. Müller-Ladner U., Kriegsmann J., Franklin B.N., Matsumoto S., Geiler T., Gay R.E., Gay S. Synovial fibroblasts of patients with rheumatoid arthritis attach to and invade normal human cartilage when engrafted into SCID mice. *Am. J. Pathol.*, 1996, Vol. 149, pp. 1607-1615.
58. Murata K., Yoshitomi H., Tanida S., Ishikawa M., Nishitani K., Ito H., Nakamura T. Plasma and synovial fluid microRNAs as potential biomarkers of rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Arthritis Res. Ther.*, 2010, Vol. 12, R86.
59. Nakamachi Y., Kawano S., Takenokuchi M., Nishimura K., Sakai Y., Chin T., Saura R., Kurosaka M., Kumagai S. MicroRNA-124a is a key regulator of proliferation and monocyte chemoattractant protein 1 secretion in fibroblast-like synoviocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, pp. 1294-1304.
60. Nakamura T., Kukita T., Shobuike T., Nagata K., Wu Z., Ogawa K., Hotokebuchi T., Kohashi O., Kukita A. Inhibition of histone deacetylase suppresses osteoclastogenesis and bone destruction by inducing IFN-beta production. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 175, pp. 5809-5816.
61. Nakasa T., Miyaki S., Okubo A., Hashimoto M., Nishida K., Ochi M., Asahara H. Expression of microRNA-146 in rheumatoid arthritis synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, pp. 1284-1292.
62. Nasu Y., Nishida K., Miyazawa S., Komiyama T., Kadota Y., Abe N., Yoshida A., Hirohata S., Ohtsuka A., Ozaki T. Trichostatin A, a histone deacetylase inhibitor, suppresses synovial inflammation and subsequent cartilage destruction in a collagen antibody-induced arthritis mouse model. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008, Vol. 16, pp. 723-732.
63. Neidhart M., Rethage J., Kuchen S., Künzler P., Crowl R.M., Billingham M.E. Retrotransposable L1 elements expressed in rheumatoid arthritis synovial tissue: association with genomic DNA hypomethylation and influence on gene expression. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, pp. 2634-2647.

64. Nile C.J., Read R.C., Akil M., Duff G.W., Wilson A.G. Methylation status of a single CpG site in the IL6 promoter is related to IL6 messenger RNA levels and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, pp. 2686-2693.
65. Nishida K., Komiyama T., Miyazawa S., Shen Z.N., Furumatsu T., Doi H., Yoshida A., Yamana J., Yamamura M., Ninomiya Y., Inoue H., Asahara H. Histone deacetylase inhibitor suppression of autoantibody-mediated arthritis in mice via regulation of p16INK4a and p21(WAF1/Cip1) expression. *Arthritis Rheum.*, 2004, Vol. 50, no. 10, pp. 3365-3376.
66. Nishioka K., Hasunuma T., Kato T., Sumida T., Kobata T. Apoptosis in rheumatoid arthritis: A novel pathway in the regulation of synovial tissue. *Arthritis Rheum.*, 1998, Vol. 41, pp. 1-9.
67. Ospelt C., Reedquist K.A., Gay S., Tak P.P. Inflammatory memories: is epigenetics the missing link to persistent stromal cell activation in rheumatoid arthritis? *Autoimmun. Rev.*, 2011, Vol. 10, no. 9, pp. 519-524.
68. Pauley K.M., Satoh M., Chan A.L., Bubbs M.R., Reeves W.H., Chan E.K. Upregulated miR-146a expression in peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients. *Arthritis Res. Ther.*, 2008, Vol. 10, R101.
69. Perlman H., Georganas C., Pagliari L.J., Koch A.E., Haines K., Pope R.M. Bcl-2 expression in synovial fibroblasts is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability. *J. Immunol.*, 2000, Vol. 164, pp. 5227-5235.
70. Pitsillides A.A., Wilkinson L.S., Mehdizadeh S., Bayliss M.T., Edwards J.C. Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell. *Int. J. Exp. Pathol.*, 1993, Vol. 74, no. 1, pp. 27-34.
71. Redlich K., Hayer S., Ricci R., David J.P., Tohidast-Akrad M., Kollias G., Steiner G., Smolen J.S., Wagner E.F., Schett G. Osteoclasts are essential for TNF- α -mediated joint destruction. *J. Clin. Invest.*, 2002, Vol. 110, pp. 1419-1427.
72. Rosengren S., Boyle D.L., Firestein G.S. Acquisition, culture, and phenotyping of synovial fibroblasts. *Methods Mol. Med.*, 2007, Vol. 135, pp. 365-375.
73. Schett G., Hayer S., Zwerina J., Redlich K., Smolen J.S. Mechanisms of disease: the link between RANKL and arthritic bone disease. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.*, 2005, Vol. 1, pp. 47-54.
74. Schulze-Koops H., Kalden J.R. The balance of Th1/Th2 cytokines in rheumatoid arthritis. *Best Pract. Res. Clin. Rheumatol.*, 2001, Vol. 15, pp. 677-691.
75. Shirinsky I.V., Shirinsky V. S. Cytokines in Rheumatoid Arthritis. In: Preedy V.R., Hunter R.J., editors. *Science publishers Jersey, British Isles, Enfield, New Hampshire: Cytokines*, 2011, pp. 403-417.
76. Stanczyk J., Ospelt C., Karouzakis E., Filer A., Raza K., Kolling C., Gay R., Buckley C.D., Tak P.P., Gay S., Kyburz D. Altered expression of microRNA-203 in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts and its role in fibroblast activation. *Arthritis Rheum.*, 2011, Vol. 63, pp. 373-381.
77. Stanczyk J., Pedrioli D.M., Brentano F., Sanchez-Pernaute O., Kolling C., Gay R.E., Detmar M., Gay S., Kyburz D. Altered expression of MicroRNA in synovial fibroblasts and synovial tissue in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2008, Vol. 58, pp. 1001-1009.
78. Sterner D.E., Berger S.L. Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, Vol. 64, no. 2, pp. 435-459.
79. Strahl B.D., Allis C.D. The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, Vol. 403, pp. 41-45.
80. Sun Y., Cheung H.S. p53, proto-oncogene and rheumatoid arthritis. *Semin. Arthr. Rheum.*, 2002, Vol. 31, no. 5, pp. 299-310.
81. Szyf M. Epigenetics, DNA methylation, and chromatin modifying drugs. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 2009, Vol. 49, pp. 243-263.
82. Takami N., Osawa K., Miura Y., Komai K., Taniguchi M., Shiraishi M., Sato K., Iguchi T., Shiozawa K., Hashimoto A., Shiozawa S. Hypermethylated promoter region of DR3, the death receptor 3 gene, in rheumatoid arthritis synovial cells. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, pp. 779-787.
83. Takayanagi H., Iizuka H., Juji T., Nakagawa T., Yamamoto A., Miyazaki T., Koshihara Y., Oda H., Nakamura K., Tanaka S. Involvement of receptor activator of nuclear factor kappaB ligand/osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis from synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2000, Vol. 43, pp. 259-269.
84. Takemura S., Braun A., Crowson C., Kurtin P.J., Cofield R.H., O'Fallon W.M., Goronzy J.J., Weyand C.M. Lymphoid neogenesis in rheumatoid synovitis. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, pp. 1072-1080.
85. Valencia X., Higgins J.M., Kiener H.P., Lee D.M., Podrebarac T.A., Dascher C.C., Watts G.F., Mizoguchi E., Simmons B., Patel D.D., Bhan A.K., Brenner M.B. Cadherin-11 provides specific cellular adhesion between fibroblast-like synoviocytes. *J. Exp. Med.*, 2004, Vol. 200, pp. 1673-1679.
86. van Oosterhout M., Levarht E.W., Sont J.K., Huizinga T.W., Toes R.E., van Laar J.M. Clinical efficacy of infliximab plus methotrexate in DMARD naive and DMARD refractory rheumatoid arthritis is associated with decreased synovial expression of TNF alpha and IL18 but not CXCL12. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, Vol. 64, pp. 537-543.
87. Vervordeldonk M.J., Tak P.P. Cytokines in rheumatoid arthritis. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2002, Vol. 4, pp. 208-217.
88. Weidauer E., Yasuda Y., Biswal B.K., Cherny M., James M.N., Brömme D. Effects of disease-modifying anti-rheumatic drugs (DMARDs) on the activities of rheumatoid arthritis-associated cathepsins K and S. *Biol. Chem.*, 2007, Vol. 388, no. 3, pp. 331-336.

89. Yamanishi Y., Boyle D.L., Rosengren S., Green D.R., Zvaifler N.J., Firestein G.S. Regional analysis of p53 mutations in rheumatoid arthritis synovium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2002, Vol. 99, no. 15, pp. 10025-10030.
90. Yasuda H., Shima N., Nakagawa N., Yamaguchi K., Kinosaki M., Mochizuki S-I., Tomoyasu A., Yano K., Goto M., Murakami A., Tsuda E., Morinaga T., Higashio K., Udagawa N., Takahashi N., Suda T. Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/ osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1998, Vol. 95, pp. 3597-3602.
91. Young C.L., Adamson T.C., Vaughan J.H., Fox R.I. Immunologic characterization of synovial membrane lymphocytes in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1984, Vol. 27, pp. 32-39.
92. Zimmermann T., Kunisch E., Pfeiffer R., Hirth A., Stahl H.D., Sack U., Laube A., Liesaus E., Roth A., Palombo-Kinne E., Emmrich F., Kinne R.W. Isolation and characterization of rheumatoid arthritis synovial fibroblasts from primary culture – primary culture cells markedly differ from fourth-passage cells. *Arthritis Res.*, 2001, Vol. 3, pp. 72-76.

Авторы:

Шнайдер М.А. — аспирант лаборатории клинической иммунофармакологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Authors:

Schneider M.A., Research Fellow, PhD student, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 08.02.2016
Принята к печати 18.02.2016

Received 08.02.2016
Accepted 18.02.2016

ОСОБЕННОСТИ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ХЕЛПЕРОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ CD45RA- И CD31-МАРКЕРЫ, У ДЕТЕЙ ПОСЛЕ ТИМЭКТОМИИ, ВЫПОЛНЕННОЙ ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ВРОЖДЕННОГО ПОРОКА СЕРДЦА

Ровда Ю.И.¹, Шмелевич С.А.², Шабалдин А.В.³, Лукоянычева Е.Б.⁴

¹ ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, Кемерово, Россия

² МБУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер», г. Кемерово, Россия

³ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

⁴ ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

Резюме. Тимэктомия является этапом хирургического лечения некоторых врожденных пороков сердца. Тимус является центральным органом иммунной системы, где идет Т-лимфопоэз и формируется центральная толерантность к аутоантигенам. Пик функциональной активности тимуса приходится на пренатальный и ранний постнатальный периоды. Проведение тимэктомии в неонатальном периоде и в младенчестве может ограничивать эти функции. Подавление Т-лимфопоэза у детей с тимэктомией может быть оценено по субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺). Для выполнения поставленной задачи проведена оценка субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ у детей (n = 40), перенесших тимэктомию при хирургическом лечении врожденного порока сердца в неонатальном или младенческом периодах постнатальной жизни. Сравнение проводилось с детьми, перенесшими в те же возрастные периоды хирургическое лечение врожденного порока сердца без тимэктомии (n = 12), и со здоровыми детьми (n = 23). Выявлено, что тимэктомия при хирургическом лечении врожденного порока сердца приводит к снижению тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ в периферической крови. Ранний возраст проведения этой операции способствует развитию дефицита в периферической крови как тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺, так и Т-лимфоцитов хелперов в целом (CD3⁺CD4⁺). Количество в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ отрицательно коррелирует с временем после проведения данной операции у детей с врожденными пороками сердца.

Ключевые слова: врожденные пороки сердца, тимэктомия, CD31, CD45RA

Адрес для переписки:

Шабалдин Андрей Владимирович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
652002, Россия, г. Кемерово, Сосновы бульвар, 6.
Тел.: 8 (903) 907-51-97.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Address for correspondence:

Shabalдин Andrey V.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases
652002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6.
Phone: 7 (903) 907-51-97.
E-mail: weit2007@yandex.ru

Образец цитирования:

Ю.И. Ровда, С.А. Шмелевич, А.В. Шабалдин, Е.Б. Лукоянычева, «Особенности субпопуляций т-лимфоцитов хелперов, экспрессирующих CD45RA и CD31 маркеры, у детей после тимэктомии, выполненной при хирургическом лечении врожденного порока сердца» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 119–128.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-119-128

© Ровда Ю.И. и соавт., 2016

For citation:

Yu.I. Rovda, S.A. Shmulevich., A.V. Shabalдин, E.B. Lukoyanycheva, "Subpopulation profiles of T helper cells expressing CD45RA and CD31 markers in children after thymectomy performed upon surgical treatment of congenital heart disease", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 119–128.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-119-128

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-119-128>

SUBPOPULATION PROFILES OF T HELPER CELLS EXPRESSING CD45RA AND CD31 MARKERS IN CHILDREN AFTER THYMECTOMY PERFORMED UPON SURGICAL TREATMENT OF CONGENITAL HEART DISEASE

Rovda Yu.I.^a, Shmulevich S.A.^b, Shabaldin A.V.^c, Lukoyanycheva E.B.^b

^a Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation

^b Kemerovo Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

^c Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

^d Kemerovo Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Thymectomy is a stage of surgery when treating some congenital heart defects. Thymus gland is the central organ of immune system. This organ is the primary site of T-cell lymphopoiesis and central tolerance to autoantigens during fetal and early postnatal life. If performed neonatally or in infancy, the thymectomy may cause restriction of these immune functions. Suppression of T-cell lymphopoiesis in children with thymectomy can be estimated as a subpopulation of thymic naive T helper cells (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺). To perform this task, we evaluated subpopulations of thymic naive T helper lymphocytes with CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ phenotype in the children (n = 40) who underwent thymectomy during surgical treatment of congenital heart diseases in neonates, or in early postnatal life. Their data were compared with children who underwent surgical treatment of congenital heart disease without thymectomy at the same age periods (n = 12), and healthy children (n = 23). We have revealed that thymectomy in frames of surgery of congenital heart disease leads to reduced thymic naive T helper lymphocytes with CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ phenotype in peripheral blood. Early execution of thymectomy is associated with deficiency of the thymic naive T helper lymphocytes in the peripheral blood, as well as a decrease in T helper cells (CD3⁺CD4⁺). The number thymic naive T helper lymphocytes in peripheral blood negatively correlated with terms elapsed after the surgery of congenital heart defects in children.

Keywords: Congenital heart anomalies, thymectomy, CD31, CD45RA

Введение

Эпидемиологические исследования показали, что врожденные пороки сердца (ВПС) имеют доминирующее значение в структуре врожденных пороков и аномалий развития плода и новорожденного ребенка и определяют процент перинатальной и младенческой смертности во многих регионах мира [16]. Проведение хирургического лечения ВПС связано с выполнением тимэктомии для улучшения визуализации структур сердца. Известно, что тимус является центральным органом иммунной системы, где происходят процессы созревания Т-лимфоцитов и формирования центральной толерантности [12]. Кроме того, в тимусе синтезируются пептиды, обладающие активирующим действием на Т-лимфоциты периферических органов иммунной системы. С этих позиций удаление тимуса, особенно в периоды новорожденности или младенчества, должно быть критичным для формирования и адаптации Т-клеточного звена иммунной системы в постнатальном периоде. Различные исследования, посвященные развитию иммунодефицитных состо-

яний у детей с ВПС и с тимэктомией, показали противоречивые результаты [2, 14]. Оценка отдаленного иммунологического катамнеза пациентов, перенесших в раннем возрасте тимэктомию при хирургическом лечении ВПС, осложняется клиническими проявлениями основного заболевания либо смертью пациента.

В конце прошлого и начале нынешнего века были охарактеризованы несколько поверхностных молекул на Т-лимфоцитах, указывающих на их «недавнее» покидание тимуса. В литературных источниках эти клетки обозначаются как наивные Т-лимфоциты тимического происхождения [11, 15].

Деление Т-лимфоцитов на наивные и зрелые стало возможным при обнаружении особенностей экспрессии на лимфоцитах изоформ поверхностной молекулы CD45. Молекула CD45 — трансмембранный белок, обладающий тирозин-фосфотазной активностью, с молекулярной массой около 220 кДа [15]. За счет альтернативного сплайсинга с гена CD45 может синтезироваться несколько изоформ конечной молекулы. Наиболее извест-

ными их них являются CD45RA (наиболее полная форма молекулы) и CD45RO (низкомолекулярная форма). Эксперименты *in vitro* показали, что в ходе культивирования моноклеаров фенотип CD45RO-CD45RA^{bright} постепенно заменяется на CD45RO^{bright}CD45RA⁻, причем последняя популяция способна отвечать пролиферацией на внесение антигена значительно быстрее и эффективнее первой [15]. Дополнительное исследование (наличие или отсутствие экспрессии) других поверхностных маркеров, в частности рецепторов к хемокинам (CCR1, CCR3, CCR5, CCR7) и молекулы селектина (CD62L), на субпопуляции Т-лимфоцитов CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺ показало правомочность выделения наивных Т-лимфоцитов хелперов. Так, наличие на наивных Т-хелперных лимфоцитах молекулы CD62L и CCR7 позволяет им эффективно проникать из крови в тимус-зависимые зоны периферических органов иммунной системы через вены с высоким эндотелием [1].

В настоящее время в наивных Т-хелперных лимфоцитах принято выделять две субпопуляции: тимические (вышедшие из тимуса) и центральные (прошедшие несколько раундов деления в периферических органах иммунной системы). На тимических наивных Т-лимфоцитах экспрессируется поверхностная адгезивная молекула CD31, а на центральных — нет [10]. CD31, или PECAM-1, относится к суперсемейству иммуноглобулинов, содержит 6 иммуноглобулиновых доменов C2-типа. Она представлена на весьма широком спектре клеток, к которым относятся лимфоциты (Т-, В- и НК-клетки), гранулоциты, макрофаги, дендритные клетки эндотелия сосудов, а также тромбоциты [8]. Лигандами для нее являются как сами CD31 других типов клеток (гомотипическое взаимодействие), так и другие молекулы — CD38, CD177, $\alpha\text{v}\beta 3$ -интегрин и т.д. (гетеротипическое взаимодействие) [1]. Основное доказательство, что Т-лимфоциты, экспрессирующие CD31, являются клетками, «недавно» покинувшими тимус, базируется на связи между экспрессией CD31 на Т-лимфоцитах и на наличии в них молекулярных маркеров реаранжировки Т-клеточного рецептора (T-cell receptor excision circles — TREC) [6, 7, 8]. Именно за счет реаранжировки Т-клеточного рецептора тимоцитов формируется центральная толерантность и иммунная компетентность. В периферических органах иммунной системы для накопления пула лимфоцитов происходит несколько этапов их деления без реаранжировки варибельной области Т-клеточного рецептора [12]. В ходе этих делений Т-лимфоциты теряют TREC, и на этих клетках уже не экспрессируется молекула CD31 [7].

В настоящее время фенотипом наивного тимического Т-лимфоцита принято считать следующий состав поверхностных молекул: CD3⁺CD45RA⁺CD45RO-CD62L⁺CCR7⁺CD31⁺. Оценка именно этой субпопуляции лимфоцитов может дать информацию о значимости тимэктомии в формировании иммунной компетентности у детей, перенесших эту операцию.

Исходя из этого, целью настоящей работы была оценка субпопуляционного состава Т-лимфоцитов периферической крови по особенностям экспрессии CD45RA и CD31 у детей, перенесших тимэктомию при хирургическом лечении ВПС.

Материалы и методы

Для выполнения поставленной задачи провели обследование 52 детей с ВПС, находившихся на стационарном лечении в детском отделении Кемеровского кардиологического диспансера и имеющих в анамнезе этап хирургического лечения ВПС. Среди детей были выделены те, у которых во время хирургического лечения была выполнена тимэктомия. Эти пациенты составили основную группу (n = 40). Дети, которым во время хирургического этапа лечения ВПС тимэктомия не проводилась, сформировали группу сравнения (n = 12). Распределение детей по диагнозам международной классификации болезней 10 пересмотра (МКБ 10) в основной группе и группе сравнения представлено в таблице 1. Данное исследование одобрено локальным этическим комитетом НИИ КПССЗ. У всех родителей взято информированное согласие об участии их детей в научном исследовании по теме «Разработка перспективных моделей оказания медицинской помощи при болезнях системы кровообращения (ОКС, периферический атеросклероз, ВПС, ППС), в том числе разработка медицинских информационных систем прогнозирования и управления рисками сердечно-сосудистых заболеваний на основании эндогенных (генетических и биохимических) и экзогенных (аэрополлютанты) показателей».

Контрольная группа была представлена 23 условно здоровыми детьми (не имеющих ВПС в анамнезе), сопоставимыми по полу и возрасту с детьми основной группы и группы сравнения. Контрольная группа формировалась на базе детских поликлиник г. Кемерово. У всех родителей в контрольной группе также было взято информированное согласие об участии их и их детей в научном исследовании по заданной теме. Средний возраст детей основной группы, группы сравнения и в контроле, а также гендерный состав групп представлен в таблице 2.

ТАБЛИЦА 1. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ РАЗЛИЧНЫХ ФОРМ ВПС СОГЛАСНО МКБ 10 В ОСНОВНОЙ ГРУППЕ И ГРУППЕ СРАВНЕНИЯ

Основная группа			Группа сравнения		
Диагноз ВПС по МКБ 10	Абсолютное число	Удельный вес, %	Диагноз ВПС по МКБ 10	Абсолютное число	Удельный вес, %
Q20.3	4	10,00	Q22.1	3	25,00
Q21.0	16	40,00	Q24.8	1	8,33
Q21.1	4	10,00	Q25.0	6	50,00
Q21.2	8	20,00	Q25.1	2	16,67
Q21.3	4	10,00	Всего	12	100,00
Q22.0	3	7,50			
Q25.1	1	2,50			
Всего	40	100,00			

ТАБЛИЦА 2. ВОЗРАСТНЫЕ И ГЕНДЕРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Показатель	1. Контрольная группа, n = 23			2. Группа сравнения, n = 12			3. Основная группа, n = 40		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
Возраст на момент обследования, в месяцах	32,10	45,34	18,87	31,00	37,36	24,64	31,21	51,99	10,42
Срок после операции, в месяцах	нет	нет	нет	18,70	32,66	4,74	19,24	36,52	1,96
Возраст на момент операции, в месяцах	нет	нет	нет	8,30	18,56	0,06	7,93	19,57	0,05
Объем тимуса, см ³	24,25	29,14	19,36	23,65	29,51	17,79	0,53*	2,17	0,05
Девочки, в %	30,43	нет	нет	33,33	нет	нет	37,50	нет	нет
Мальчики, в %	69,57	нет	нет	66,67	нет	нет	62,50	нет	нет

Примечание. Me – медиана, LQ – верхняя граница межквартильного интервала, UQ – нижняя граница межквартильного интервала. Все сравнения $p_{1,2}$, $p_{1,3}$ и $p_{2,3} > 0,05$, кроме объема тимуса * – $p_{1,3} < 0,001$ и $p_{2,3} < 0,001$.

Всем детям проведено ультразвуковое исследование тимуса. На основе этих данных был рассчитан объем тимуса в см³. В основной группе у 33 детей (82,5%) тимус не лоцировался, у 6 детей (15,0%) объем тимуса находился в пределах 1-2 см³ и у 1 ребенка (2,5%) был равен 8,62 см³. В таблице 2 показаны достоверно значимые различия по объему тимуса между основной группой, группой сравнения и контролем.

Оценку субпопуляций Т-лимфоцитов проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 с программным обеспечением CXP (Beckman Coulter, USA) с помощью определения экспрессии поверхностных маркеров лимфоцитов (CD): CD3, CD4, CD45RA, CD31⁺, которые выделяли из периферической крови. Для проведения иммунофенотипирования Т-лимфоцитов

применяли четырехцветную комбинацию конъюгированных моноклональных антител в реакции прямой иммунофлуоресценции, используя антиCD3-PC7, антиCD4-PC5, антиCD45RA-PE, антиCD31-FITC (Beckman Coulter, USA). Соотношение объема антител к количеству лимфоцитов, время и температура инкубаций соответствовали прилагаемым инструкциям к каждому конъюгированному моноклональному антителу. Для снятия результатов был разработан протокол проточной цитофлуориметрии, отраженный на рисунке 1-4. Подготавливали 4 окна (соответствуют рисункам 1 [см. 3-ю стр. обложки], 2, 3, 4). На рисунке 1 показано гейтирование облака лимфоцитов (V область), выделенных по их размеру (прямое [малоугловое] светорассеяние – forward

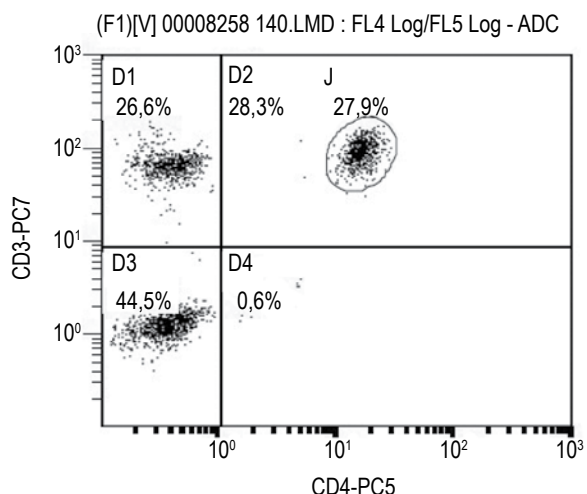


Рисунок 2. Субпопуляции лимфоцитов, экспрессирующие CD3- и CD4-маркеры дифференцировки

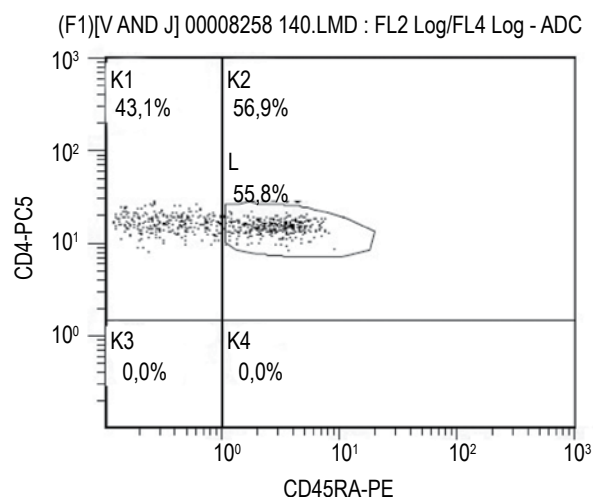


Рисунок 3. Субпопуляции Т-лимфоцитов хелперов (CD3⁺CD4⁺), экспрессирующие CD4- и CD45RA-маркеры дифференцировки

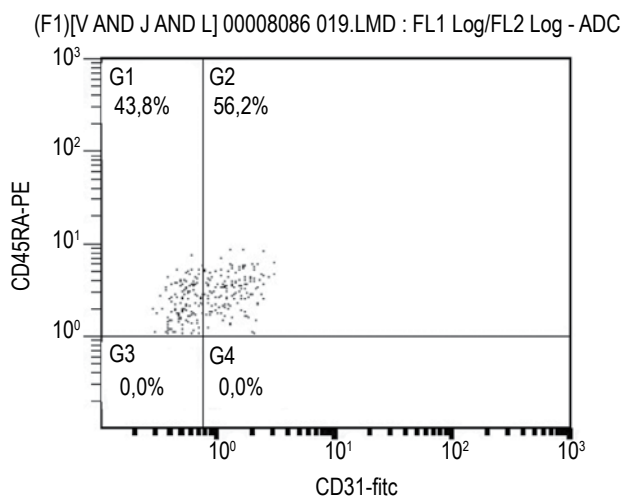


Рисунок 4. Субпопуляции наивных Т-лимфоцитов хелперов (CD4⁺CD45RA⁺), экспрессирующие CD45RA- и CD31-маркеры дифференцировки

scatter — FS) и по внутриклеточной организации (боковое светорассеяние — side scatter — SS).

Следующее окно (рис. 2) было связано с выделенной областью V (первичное гейтирование лимфоцитов) и отражало распределения лимфоцитов по особенностям экспрессии CD3 (CD3-PC7) и CD4 (CD4-PC5). Для дальнейшего исследования были гейтированы лимфоциты CD3⁺CD4⁺ (область J). В этом окне отражалось относительное содержание CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов (указан процент), CD3⁺CD4⁻ (указан процент), CD3⁻CD4⁻ (указан процент) и CD3⁻CD4⁺ (указан процент). Последняя субпопуляция является моноцитами, попавшими в гейт V. Как видно из рисунка 2, этих клеток было менее 1%, что указывает на чистоту первичного выделения лимфоцитов по их размеру и внутриклеточной организации.

В третьем окне (рис. 3) показано распределение Т-лимфоцитов с маркерами дифференцировки CD4 и CD45RA. Это окно связано с гейтом J (CD3⁺CD4⁺), и поэтому указанное в нем процентное содержание клеток с фенотипами CD4⁺CD45RA⁺, CD4⁺CD45RA⁻, CD4⁻CD45RA⁺ и CD4⁻CD45RA⁻ отражает содержание этих субпопуляций относительно CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов. Интересующей субпопуляцией являлась CD4⁺CD45RA⁺, которая в этом окне также выделялась в отдельный гейт L.

В конечном четвертом окне (рис. 4) представлены субпопуляции наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD4⁺CD45RA⁺, так как это окно было связано с гейтом L. Субпопуляционный состав этих клеток был определен по экспрессии CD45RA и CD31. Как видно из рисунка, в области G2 были представлены лимфоциты, экспрессирующие CD31 (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺) — тимические наивные Т-лимфоциты хелперы, а в области G1 — не экспрессирующие этот маркер (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁻) — центральные наивные Т-лимфоциты хелперы. Также из рисунка видно, что в областях G3 и G4 клеток не обнаружено. Это указывает на чистоту первично выделенных лимфоцитов и на правомочность полученных результатов.

Всем пациентам был выполнен общий анализ крови с подсчетом общих лейкоцитов и их популяций (лейкоцитарная формула), что позволило рассчитать субпопуляционный состав Т-лимфоцитов хелперов в абсолютных значениях (тысяч клеток на мкл).

Анализ данных проводили с помощью стандартных медико-статистических методов, используя пакет прикладных программ Statistica for Windows, 6.0 (StatSoft, USA, 1999). Непараметрические количественные показатели сравнивали с помощью критерия Манна—Уитни, а для выявления ассоциативных связей проводили корре-

ляцию по Спирмену. Результаты считали статистически значимыми при ошибке менее 5%, что соответствует медико-биологическим исследованиям.

Результаты

Проведенное исследование показало (табл. 3), что популяционный состав лейкоцитов периферической крови у детей основной группы был сопоставим с контролем, и достоверно значимых отличий по относительному и абсолютному содержанию основных популяций лейкоцитов между этими группами не выявлено ($p > 0,05$). У детей с ВПС, но без тимэктомии (группа сравнения) отмечено повышение относительного содержания лимфоцитов периферической крови. По этому показателю группа сравнения достоверно отличалась как от контрольной ($p < 0,05$), так и от основной группы ($p < 0,05$). В то же время абсолютное количество лимфоцитов в трех группах было сопоставимо ($p > 0,05$).

Исследование субпопуляционного состава Т-лимфоцитов хелперов ($CD3^+CD4^+$) в периферической крови у обследованных детей показало следующее (табл. 4). В основной группе (дети с ВПС и тимэктомией) относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+$ было достоверно ниже, чем в контрольной группе и в группе сравнения ($p < 0,001$). Удельный вес наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ и их абсолютное количество в периферической крови были также достоверно ниже, чем в контрольной группе и группе сравнения ($p < 0,01$ для относи-

тельных показателей и $p < 0,05$ для абсолютных). Аналогичная ситуация выявлена для субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$. Относительное и абсолютное количество этих клеток было достоверно ниже в основной группе по сравнению с контрольной группой ($p < 0,01$ для относительных показателей и $p < 0,05$ для абсолютных).

Группа сравнения (дети с ВПС, но без тимэктомии) имела достоверно значимые отличия по субпопуляционному составу Т-лимфоцитов хелперов от группы контроля. Достоверно значимые отличия по этим показателям от основной группы представлены в таблице 4. Относительное и абсолютное количество Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+$ достоверно не отличалось от контрольной группы ($p > 0,05$). Удельный вес и абсолютное количество наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ были достоверно выше, чем в контрольной группе ($p < 0,01$ для относительного показателя и $p < 0,05$ для абсолютного). Сравнимая ситуация была получена и для субпопуляции тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$, абсолютное и относительное количество которых было достоверно выше в группе сравнения, чем в контроле ($p < 0,01$ для относительного показателя и $p < 0,05$ для абсолютного).

Таким образом, исследование показало, что тимэктомия приводит к уменьшению абсолютного числа тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов в периферической крови. Из литера-

ТАБЛИЦА 3. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ПОПУЛЯЦИЙ ЛЕЙКОЦИТОВ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Показатель	1. Контрольная группа, n = 23			2. Группа сравнения, n = 12			3. Основная группа, n = 40		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
Лейкоциты, тыс/мкл	6,95	8,02	5,88	7,62	8,98	6,26	7,13	9,66	4,59
Эозинофильные гранулоциты, %	3,51	5,61	1,42	4,10	5,40	2,80	3,40	5,64	1,16
Палочкоядерные гранулоциты, %	1,07	1,90	0,24	1,03	1,78	0,28	0,78	2,12	-0,57
Сегментоядерные гранулоциты, %	36,21	48,02	24,41	35,40	48,08	22,72	36,53	51,85	21,20
Лимфоциты, %	50,14	61,79	38,50	52,2*	66,16	38,24	50,88**	63,71	38,04
Лимфоциты, тыс./мкл	3,25	4,01	2,49	3,47	4,41	2,50	3,43	4,96	2,36
Моноциты, %	8,86	10,32	7,40	8,20	10,59	5,81	8,83	12,47	5,18

Примечание. Me – медиана, LQ – верхняя граница межквартильного интервала, UQ – нижняя граница межквартильного интервала. Все сравнения $p_{1,2}$, $p_{1,3}$ и $p_{2,3} > 0,05$, кроме относительного содержания лимфоцитов в периферической крови * – $p_{1,2} < 0,05$ и $p_{2,3} < 0,05$.

ТАБЛИЦА 4. ОСОБЕННОСТИ РАСПРЕДЕЛЕНИЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ ХЕЛПЕРОВ У ОБСЛЕДОВАННЫХ ДЕТЕЙ

Показатель	1. Контрольная группа, n = 23			2. Группа сравнения, n = 12			3. Основная группа, n = 40		
	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ	Me	LQ	UQ
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	39,64	46,41	32,88	39,80*	41,44	38,16	31,88	40,90	22,85
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , абс	1,87	2,12	1,62	1,88*	2,24	1,53	0,86	1,17	0,55
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ , % от CD3 ⁺ CD4 ⁺	54,43	63,44	45,42	63,40	68,23	58,57	43,38	59,53	27,22
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ , тыс./мкл	0,58	0,75	0,41	1,18	1,35	1,02	0,28	0,42	0,15
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ CD31 ⁺ , % от CD45RA ⁺ CD4 ⁺	81,64	88,51	74,77	85,80	89,15	82,45	70,93	86,30	55,55
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ CD31 ⁺ , тыс./мкл	0,52	0,66	0,37	1,02	1,17	0,86	0,23	0,36	0,10

Примечание. Me – медиана, LQ – верхняя граница межквартильного интервала, UQ – нижняя граница межквартильного интервала. Все сравнения имеют достоверно значимые различия $p_{1,2}$, $p_{1,3}$ и $p_{2,3} < 0,05$, кроме относительного и абсолютного содержания в периферической крови Т-лимфоцитов хелперов (CD3⁺CD4⁺) в контроле и в группе сравнения * – $p_{1,2} > 0,05$.

турных данных известно, что после тимэктомии количество этих клеток постепенно снижается в периферической крови. Для подтверждения этого факта провели корреляционное исследование между сроком после проведенной тимэктомии и временем самой тимэктомии с одной стороны и субпопуляционным составом Т-лимфоцитов хелперов периферической крови с другой (табл. 5).

Из таблицы 5 видно, что между уровнями субпопуляций Т-лимфоцитов хелперов с одной стороны и сроком тимэктомии и временем после нее с другой имеются достоверно значимые

корреляции. Достоверно значимая положительная корреляция достигнута для пары «относительное содержание CD3⁺CD4⁺ – возраст на момент тимэктомии» ($R = 0,37$; $p < 0,05$). Эти данные указывают, что чем раньше проведена тимэктомия, тем меньше в периферической крови субпопуляции (относительно других субпопуляций) Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺. В то же время для абсолютного числа Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺ достоверно значимой корреляции с возрастом проведения тимэктомии не выявлено. Достоверно значимая положительная корреляция по-

ТАБЛИЦА 5. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ ПО СПИРМЕНУ МЕЖДУ СРОКОМ ТИМЭКТОМИИ И ВРЕМЕНЕМ ПОСЛЕ НЕЁ С ОДНОЙ СТОРОНЫ И СУБПОПУЛЯЦИОННЫМ СОСТАВОМ Т-ЛИМФОЦИТОВ ХЕЛПЕРОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ С ДРУГОЙ

Показатель	Срок после тимэктомии, в месяцах			Возраст на момент тимэктомии, в месяцах		
	Spearman R	t(N-2)	p-level	Spearman R	t(N-2)	p-level
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	0,2447	1,5560	0,1280	0,3741	2,4867	0,0174
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , абс	0,0059	0,0362	0,9713	0,0741	0,0403	0,9681
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ , % от CD3 ⁺ CD4 ⁺	-0,4199	-2,8518	0,0070	0,0168	0,1038	0,9179
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ , тыс./мкл	-0,3543	-2,3357	0,0249	0,0337	0,2081	0,8363
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ CD31 ⁺ , % от CD45RA ⁺ CD4 ⁺	-0,3416	-1,9450	0,0591	0,4603	3,1965	0,0028
CD45RA ⁺ CD4 ⁺ CD31 ⁺ , тыс./мкл	-0,3816	-1,9850	0,0471	0,1229	0,7635	0,4499

Примечание. Выделены достоверно значимые уровни корреляций.

лучена и для пары «относительное содержание $CD4^+CD45RA^+CD31^+$ — возраст на момент тимэктомии» ($R = 0,46$; $p < 0,05$). Этот результат указывает на тот факт, что чем раньше проведена тимэктомия, тем меньше в периферической крови субпопуляции (относительно других субпопуляций) тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$. Для абсолютного количества лимфоцитов с таким фенотипом достоверно значимой корреляции с возрастом тимэктомии не получено. Абсолютное количество лимфоцитов с различными фенотипами зависит от общего количества лейкоцитов и их популяционного состава, но эти показатели достаточно лабильны. Именно этим можно объяснить отсутствие корреляций между абсолютным количеством Т-лимфоцитов хелперов и тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с возрастом проведения тимэктомии.

Срок после тимэктомии отрицательно достоверно коррелировал с абсолютным и относительным количеством в периферической крови наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+$ ($R = 0,42$; $p < 0,01$ — для относительного содержания и $R = 0,35$; $p < 0,05$ — для абсолютного содержания). Эти данные указывают на тот факт, что чем больше времени прошло после тимэктомии, тем меньше в периферической крови обнаруживалось наивных Т-лимфоцитов хелперов, причем как относительно других субпопуляций, так и в абсолютных значениях. Кроме того, получена отрицательная достоверно значимая корреляция между абсолютным содержанием в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ и сроком после тимэктомии ($R = 0,38$, $p < 0,05$). Эти данные подтверждают сформулированный выше посыл о том, что чем больше времени прошло после тимэктомии, тем меньше в периферической крови остается тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов.

Таким образом, основным результатом проведенного исследования стало доказательство связи между тимэктомией и временем после ее проведения и уменьшением в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов.

Обсуждение

Тимус является основным местом Т-клеточного лимфопоэза в пренатальный и ранний постнатальный периоды. Основная функция тимуса связана с формированием центральной толерантности к аутоантигенам [12]. Этот процесс обеспечивается индуктивным

микроокружением, пролиферацией тимоцитов, а на молекулярном уровне — V(D)J рекомбинациями в α -, β -, γ - и δ -цепях Т-клеточного рецептора (ТКР) [13]. При этих рекомбинациях формируются иссеченные из генов ТКР внехромосомные ДНК кольца, обозначаемые как Т-cell receptor excision circles — TREC. Высокий уровень sjTREC (signal joint) в тимоцитах связан с рекомбинациями в D-локусе α -цепи ТКР [8]. В субпопуляции лимфоцитов периферической крови с фенотипом $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ уровень sjTREC незначительно ниже, чем в тимоцитах [8]. Длина теломеров и уровень активности теломеразы были значительно больше у субпопуляции $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ по сравнению с лимфоцитами $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^-$ [1, 6]. Приведенные результаты исследований указывают на то, что $CD31^+$ наивные Т-хелперы можно рассматривать в качестве одной из самых слабо дифференцированных популяций, сравнительно недавно покинувших тимус Т-клеток [1]. С этих позиций проведенный анализ субпопуляции $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD31^+$ у детей после тимэктомии можно сопоставить с ранее выполненными работами по анализу уровней TREC в лимфоцитах периферической крови у детей после тимэктомии.

Надо отметить, что вопрос о формировании Т-клеточного иммунодефицита у детей с ранней тимэктомией остается открытым [13]. Однако тимэктомия в период новорожденности или в первые месяцы жизни может прерывать еще сохраняющийся процесс формирования центральной толерантности на аутоантигены. Более того, ряд исследователей показали полноценное функционирование тимуса в зрелом возрасте [3, 5]. Соответственно, встает вопрос о риске развития аутоиммунных заболеваний у этих детей.

Исследования показали, что у пациентов, перенесших тимэктомию в раннем возрасте, уровень TREC и наивных $CD4^+$ Т-клеток был заметно снижен через много лет после операции [4]. Сравнение уровней TREC у детей с ВПС до тимэктомии и после нее через 12 дней и 6 лет показало их значительное снижение, как в ближайшем послеоперационном периоде, так и в отдаленном времени. Также было показано, что у детей после оперативного лечения ВПС, но без тимэктомии, уровень TREC был значительно выше, чем у детей с тимэктомией [9]. Авторы делают заключение, о том что пролонгированное снижение TREC (через 6 лет после операции) связано с ограничением тимопоэза [9]. Было показано, что у пациентов без остаточного тимуса (полная тимэктомия) отмечено достоверное снижение TREC по отношению к пациентам с частичной тимэктомией [4]. Приведет ли снижение

TREC при полном удалении тимуса к дефициту регуляторных Т-лимфоцитов тимического происхождения и разовьются ли у этих пациентов аутоиммунные заболевания — остается неизвестным [9].

Настоящее исследование показало, что основной тренд субпопуляции CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ лимфоцитов периферической крови после проведенной тимэктомии схож с динамикой TREC после этой операции. Более того, показано, что чем раньше к моменту рождения ребенка удаляется тимус, тем меньше в периферической крови становится не только субпопуляция тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов (CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺), но и Т-хелперов в целом (CD3⁺CD4⁺), что может негативно влиять на формирование иммунной компетентности у этих детей.

Можно согласиться с рекомендациями ряда авторов о необходимости проведения частичной тимэктомии при оперативном лечении ВПС, так как эта операция в младенчестве, хотя и приводит к снижению TREC, но не оказывает выраженного негативного влияния на иммунную функцию [9]. Доказано, что минимальной остаточной ткани тимуса достаточно для осуществления иммунной функции [9].

Выполненная работа показала правомочность исследования субпопуляции CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ для оценки эффективности тимопоеза после тимэктомии у детей, подвергшихся оперативному лечению ВПС, и в качестве альтернативы измерению уровня TREC в лимфоцитах периферической крови у этих пациентов.

Выводы

1. Тимэктомия при оперативном лечении ВПС приводит к снижению тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ в периферической крови.

2. Ранний возраст проведения полной тимэктомии при оперативном лечении ВПС ассоциирован с дефицитом в периферической крови как тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺, так и Т-лимфоцитов хелперов в целом (CD3⁺CD4⁺).

3. Количество в периферической крови тимических наивных Т-лимфоцитов хелперов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ отрицательно коррелирует с временем после проведенной у детей тимэктомии при оперативном лечении ВПС.

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8, № 17. С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. T-memory cells: basic population and stage of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology*, 2014, Vol. 8, no. 17, pp. 947-964. (In Russ.)]
2. Brearley S., Gentle T.A., Baynham M.I., Roberts K.D., Abrams L.D., Thompson R.A. Immunodeficiency following neonatal thymectomy in man. *Clin. Exp. Immunol.*, 1997, Vol. 70, pp. 322-327.
3. Fry T.J., Mackall C.L. Current concepts of thymic aging. *Springer Semin. Immunopathol.*, 2002, Vol. 24, pp. 7-22.
4. Halnon N.J., Jamieson B., Plunkett M., Kitchen C.M., Pham T., Krogstad P. Thymic function and impaired maintenance of peripheral T-cell populations in children with congenital heart disease and surgical thymectomy. *Pediatr. Res.*, 2005, Vol. 57, pp. 42-48.
5. Jamieson B.D. Generation of functional thymocytes in the human adult. *Immunity*, 1999, Vol. 10, pp. 569-575.
6. Junge S., Kloeckener-Gruissem B., Zufferey R., Keisker A., Salgo B. Correlation between recent thymic emigrants and CD31⁺ (PECAM-1) CD4⁺ T cells in normal individuals during aging and in lymphopenic children. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, pp. 3270-3280.
7. Kimmig S., Przybylski G.K., Schmidt C.A., Laurisch K., Mowes B. Two subsets of naive T helper cells with distinct T cell receptor excision circle content in human adult peripheral blood. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 195, pp. 789-794.
8. Kohler S., Thiel A. Life after the thymus: CD31⁺ and CD31⁻ human naive CD4⁺ T-cell subsets. *Blood*, 2009, Vol. 113, pp. 769-774.
9. Madhok A.B., Chandrasekaran A., Parnell V., Gandhi M., Chowdhury D., Pahwa S. Levels of Recent Thymic Emigrant Cells Decrease in Children Undergoing Partial Thymectomy during Cardiac Surgery. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2005, Vol. 12, no. 5, pp. 563-565.
10. Marelli-Berg F.M., Clement M., Mauro C., Caligiuri G. An immunologist's guide to CD31 function in T-cells. *J. Cell Sci.*, 2013, Vol. 126, pp. 2343-2352.
11. Merckenschlager M., Terry L., Edwards R., Beverley P.C. Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte populations defined by the monoclonal antibody UCHL1: implications for differential CD45 expression in T cell memory formation. *Eur. J. Immunol.*, 1988, Vol. 18, pp. 1653-1661.

12. Peterson P., Tönis Org, Rebane A. Transcriptional regulation by AIRE: molecular mechanisms of central tolerance. *Nature Reviews Immunology*, 2008, Vol. 8, pp. 948-957.
13. Roifman C.M. Studies of patients' thymic aid in the discovery and characterization of immunodeficiency in humans. *Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 203, pp. 143-155.
14. Wells P.R., Smogorzewska E., Barr M. Neonatal thymectomy: does it affect immune function? *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 1998, Vol. 115, pp. 1041-1046.
15. Young J.L., Ramage J.M., Gaston J.S., Beverley P.C. *In vitro* responses of human CD45R0^{bright}RA⁻ and CD45R0⁻RA^{bright} T cell subsets and their relationship to memory and naive T cells. *Eur. J. Immunol.* 1997, Vol. 27, pp. 2383-2390.
16. <http://www.eurocat-network.eu> (дата обращения: 03.09.2015).

Авторы:

Ровда Ю.И. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии и неонатологии ГБОУ ВПО «Кемеровская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Шмелевич С.А. — заведующая отделением детской кардиологии МБУЗ «Кемеровский кардиологический диспансер», г. Кемерово, Россия

Шабалдин А.В. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клеточных технологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Лукоянычева Е.Б. — заведующая иммунологической лабораторией ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», г. Кемерово, Россия

Authors:

Rovda Yu.I., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Pediatrics and Neonatology, Kemerovo State Medical Academy, Kemerovo, Russian Federation

Shmulevich S.A., Head, Department of Pediatric Cardiology, Kemerovo Cardiology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation

Shabaldin A.V., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Technologies, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Lukoyanycheva E.B., Head, Immunology Laboratory, Kemerovo Regional Hospital, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 15.10.2015
Принята к печати 04.12.2015

Received 15.10.2015
Accepted 04.12.2015

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ОЦЕНКИ ПОСТВАКЦИНАЛЬНОЙ СЕКРЕЦИИ АНТИТЕЛ В-ЛИМФОЦИТАМИ *IN VITRO* ДЛЯ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУНОГЕННОСТИ В КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ РЕЗЕРВНЫХ ГРИППОЗНЫХ ВАКЦИН А (H5N1) И А (H5N2)

Лосев И.В.¹, Дони́на С.А.¹, Петухова Г.Д.¹, Ерофеева М.К.²,
Руденко Л.Г.¹, Найхин А.Н.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В мире накоплено достаточно данных о необходимости усовершенствования оценки иммуногенности гриппозных вакцин. В нашей стране для определения их иммуногенности регламентирован единственный тест — постановка реакции торможения гемагглютинации (РТГА) с сыворотками крови вакцинированных лиц. Он далеко не полностью отражает поствакцинальные иммунные изменения в организме. Нами проведено изучение у волонтеров, ранее праймированных резервной живой гриппозной вакциной А (H5N2), иммуногенной активности инактивированной гриппозной вакцины (ИГВ), приготовленной из потенциально пандемического птичьего вируса гриппа А (H5N1) NIBRG-23. Сравнивали три метода: иммуоферментный анализ (ИФА) и РТГА с сыворотками крови (сывороточные антитела), и альтернативный подход, заключающийся в тестировании в ИФА анти-тел, секретируемых В-клетками *in vitro* в надосадках культур мононуклеаров периферической крови (МПК) (секретируемые антитела). Показано значительное преимущество последнего метода в выявлении количества поствакцинальных конверсий IgA- и IgG-антител на раннем сроке после первой прививки (седьмой день). Эти данные позволили полностью оценить иммуногенность ИГВ H5N1, не прибегая к данным, полученным на более поздних сроках: 28-й день после первой прививки и 28-й день после второй прививки.

Вывод: испытанная методика определения в ИФА секреции антител *in vitro* может быть использована в качестве альтернативного теста для оценки иммуногенности гриппозных вакцин. Этот метод дает более точное представление о штаммоспецифическом гуморальном иммунном ответе.

Ключевые слова: вирус гриппа, определение иммуногенности, иммунный ответ, гуморальный, мононуклеарные клетки, периферическая кровь, супернатанты

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

И.В. Лосев, С.А. Дони́на, Г.Д. Петухова,
М.К. Ерофеева, Л.Г. Руденко, А.Н. Найхин,
«Использование метода оценки поствакцинальной
секреции антител В-лимфоцитами *in vitro*
для характеристики иммуногенности в клинических
испытаниях резервных гриппозных вакцин А (H5N1)
и А (H5N2)» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18,
№ 2. С. 129–138. doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-129-138
© Лосев И.В. и соавт., 2016

For citation:

I.V. Losev, S.A. Donina, G.D. Petukhova, M.K. Erofeeva,
L.G. Rudenko, A.N. Naykhin, “Application of method based on
in vitro antibody quantification in PBMC supernatant samples
for immunogenicity evaluation of A (H5N1) and A (H5N2)
potentially pandemic influenza vaccines in clinical trials”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 2, pp. 129–138.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-129-138
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-129-138

APPLICATION OF METHOD BASED ON *IN VITRO* ANTIBODY QUANTIFICATION IN PBMC SUPERNATANT SAMPLES FOR IMMUNOGENICITY EVALUATION OF A (H5N1) AND A (H5N2) POTENTIALLY PANDEMIC INFLUENZA VACCINES IN CLINICAL TRIALS

Losev I.V.^a, Donina S.A.^a, Petukhova G.D.^a, Erofeeva M.K.^b,
Rudenko L.G.^a, Naykhin A.N.^a

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

^b Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. There are many data worldwide which suggest that the methods for evaluation of influenza vaccines immunogenicity should be improved. The only method validated in Russia is a HAI (haemagglutination inhibition) assay with serum samples from vaccinated volunteers. This assay does not, however, completely reflect the vaccine-induced immunological changes. In this study, we evaluated antibody immune responses to A (H5N1) inactivated influenza vaccine boosting in healthy volunteers previously primed with A (H5N2) live attenuated influenza vaccine. We compared three methods of antibody detection: (i) HAI assay with serum samples; (ii) ELISA with serum samples; (iii) ELISA with PBMC (peripheral blood mononuclear cells) culture supernates, i.e., an alternative test based on quantification of antibodies secreted by PBMC *in vitro*. The latter test was shown to have an advantage over other techniques in IgA and IgG antibody detection at early timepoints (day 7) after vaccination. The first two methods allowed immunogenicity assessment at day 28 after vaccination.

Thus, a test based on antibody quantification in PBMC supernatant samples can be used as an alternative method for evaluation of influenza vaccines immunogenicity. This method also exhibits a better strain-specificity.

Keywords: influenza virus, immunogenicity, immune response, humoral, mononuclear cells, peripheral blood, supernates

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 14-15-00034.

Введение

В мире для профилактики гриппа успешно используются живые аттенуированные (ЖГВ) и инактивированные (ИГВ) вакцины. Протективность этих вакцин тесно связана с их иммуногенностью, то есть способностью стимулировать адаптивный иммунный ответ. Важным компонентом адаптивного противогриппозного иммунитета являются антитела сыворотки крови (сывороточные, циркулирующие антитела). Обычно количественные параметры поствакцинальной продукции данных антител тестируются в реакции торможения гемагглютинации (РТГА), реакции микронейтрализации (РМН) и в иммуноферментном анализе (ИФА). ИФА обладает большей чувствительностью, дает возможность определять специфические иммуноглобулины

разных классов и подклассов, а также позволяет выявлять более широкий спектр антител. Показана связь уровня сывороточных антител, определяемых в ИФА, с защитой от гриппа [2, 6]. В то же время имеются и альтернативные данные об отсутствии или весьма слабом влиянии сывороточных антител на противогриппозную протекцию [16]. Существует способ определения антител не в сыворотках крови, а в насадках культур мононуклеаров периферической крови, то есть антител, секретируемых зрелыми В-лимфоцитами *in vitro* [9]. Этот подход апробирован при изучении поствакцинального иммунного ответа на прививку людей против столбняка [7], холеры [14], брюшного тифа [15]. Кроме того, он применен при оценке иммуногенности сезонной коммерческой тривалентной ИГВ [9].

В настоящей статье приведены сравнительные данные по оценке у волонтеров иммуногенности резервной моновалентной ИГВ, приготовленной из потенциально пандемического птичьего вируса А (H5N1). Эти волонтеры были привиты полтора года назад ЖГВ (H5N2). Сравнивали два методических подхода: определение сывороточных антител в ИФА и РТГА и детекция в ИФА антител, секретируемых В-клетками в надосадках культур МПК (далее – секретируемые антитела). Параллельно оценивали иммунный ответ после первой и повторной прививки к гомологичному вакцинному вирусу А (H5N1) и гетеросубтипичскому птичьему вирусу А (H5N2).

Материалы и методы

Вакцины

Волонтеры прививались парентерально дважды с интервалом в 28 дней субъединичной адсорбированной ИГВ «Orny flu». Вакцина изготовлена на основе штамма NIBRG-23 (H5N1). За полтора года до этого все волонтеры были дважды иммунизированы (праймированы) интраназально реассортантной ЖГВ «Ультрагивак», изготовленной на основе штамма A/17/turkey/Turkey/05/133 (H5N2).

Волонтеры

Испытание вакцин на волонтерах проведено в полном соответствии с национальным стандартом Российской Федерации (ГОСТ Р 52379-2005) «Надлежащая клиническая практика», отражающем международный этический и научный стандарт планирования и проведения исследований с участием человека (Good Clinical Practice; GCP).

ЖГВ H5N2 инокулировали стандартным коммерческим распылителем в обе ноздри по 0,5 мл в каждую. ИГВ H5N1 вводили парентерально. Сыворотки крови отбирали у волонтеров до вакцинации (Д0), через 7 дней после первой вакцинации (Д7), через 28 дней после первой вакцинации (Д28) и спустя 28 дней после повторной вакцинации (Д56). Эта схема давала возможность оценить иммунный ответ в отдельности на обе прививки.

В опыте участвовало 19 человек. Из них 12 (63%) были мужчинами и 7 (37%) – женщинами. Возраст колебался от 20 до 51 года. Среднее значение возраста составляло 30 лет.

Определение сывороточных антигемагглютинирующих антител (АТ) в реакции торможения геагглютинации (РТГА). РТГА выполняли по методике, рекомендованной ВОЗ [12].

Сыворотки крови обрабатывали RDE (receptor destroyed enzyme). Рабочая доза антигена – 4 АЕ. Использовали 1% взвесь лошадиных и человеческих эритроцитов 0(I) группы крови. Достоверными увеличениями (конверсиями) титров АТ считали их поствакцинальное повышение в 4 раза и более по отношению к довакцинальному уровню.

Иммуноферментный анализ (ИФА). IgA- и IgG-антитела в сыворотке крови и в надосадках культур лимфоцитов выявляли в ИФА по ранее описанной методике [1]. На планшете сорбировали 16 АЕ вирусов, очищенных центрифугированием в градиенте плотности сахарозы (30-60%). За титр сывороточных и локальных антител принимали наибольшее разведение исследуемого материала, при котором оптическая плотность (ОП) лунки с образцами превышала среднюю ОП в контрольных лунках (все ингредиенты реакции, не содержащие исследуемый материал) в 2 раза и более. За достоверный прирост титров антител в сыворотке крови и в СВДП принимали его увеличение в 4 раза и более.

Определение в ИФА антител, секретируемых культурами МПК, проводилось по методике He X.S. с соавторами [9]. Из крови волонтеров выделяли МПК в градиенте плотности, с использованием раствора «Histopaque». Полученные клетки культивировали в течение 4 дней при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. По окончании инкубации собирали надосадки, которые очищали центрифугированием в течение 10 минут при 1500 оборотах в минуту. Полученные образцы замораживали при температуре -70 °С до исследования.

Статистическая обработка результатов. Использовали программное обеспечение Statistica и Graph Pad Prism 5. Для сравнения данных применяли Wilcoxon Mathed Paire Test, Friaman ANOVA и Fisher exact (two-tailed).

Результаты

На рисунке 1 представлены данные о динамических изменениях у прививавшихся волонтеров средних геометрических титров (СГТ) изучаемых антител к вакцинному А (H5N1) и гетеросубтипичскому А(H5N2) вирусам.

Обнаружено, что иммунизация ИГВ H5N1 сопровождалась накоплением не только сывороточных, но и секретируемых антител к обоим вирусам. При этом имелось как сходство, так и отличие в продукции этих антител. Сход-

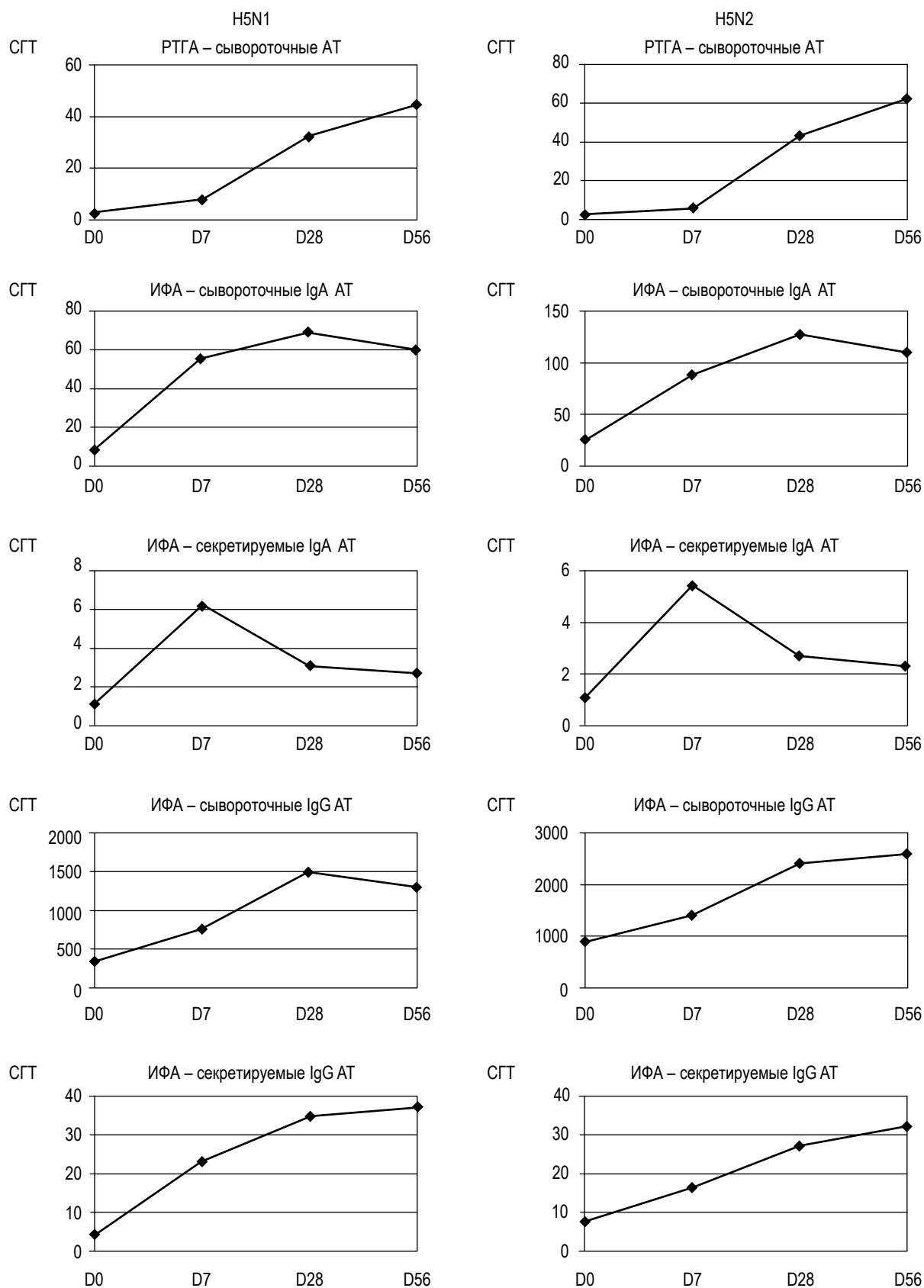


Рисунок 1. Средние геометрические титры (СГТ) антител (АТ) у волонтеров, привитых ИГВ H5N1

Примечание. D0 – до вакцинации; D7 – на 7 день после первой вакцинации; D28 – на 28 день после первой вакцинации, в день второй вакцинации; D56 – на 56 день после первой вакцинации и 28 день после второй вакцинации.

ТАБЛИЦА 1. ИНДИВИДУАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О НАЛИЧИИ КОНВЕРСИЙ АНТИТЕЛ У ВОЛОНТЕРОВ НА СЕДЬМОЙ ДЕНЬ ПОСЛЕ ПЕРВОЙ ПРИВИВКИ ИГВ H5N1

N волонтера в опыте		Конверсия антител (+)																										
		РТГА		Надосадки культур МПК								Сыворотки крови								Всего по всем тестам								
				A (H5N1)				A (H5N2)				A (H5N1) и/или A (H5N2)				A (H5N1)					A (H5N2)				A (H5N1) и/или A (H5N2)			
				IgA	IgG	IgA + IgG	IgA	IgG	IgA + IgG	IgA	IgG	IgA + IgG	IgA	IgG	IgA + IgG	IgA	IgG	IgA + IgG	IgA		IgG	IgA + IgG	IgA	IgG	IgA + IgG			
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
4		+		+		+		+		+		+		+		+		+		+		+		+	+			
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
9																												
20			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
26	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
27																												
28			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
30		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
31		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
36			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
38			+			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
42	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
44	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
45			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
46																									+			
48				+	+																				+			
54				+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
56			+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
Итого 19 человек	5 (26%)	5 (26%)	14 (74%)	11 (58%)	16 (84%)	14 (74%)	9 (47%)	15 (79%)	14 (74%)	11 (58%)	16 (84%)	9 (47%)	5 (26,3%)	10 (53%)	12 (63%)	5 (26,3%)	13 (68%)	17 (90%)										

ство проявлялось, во-первых, в том, что в обоих случаях СГТ IgG-антител были выше СГТ IgA-антител, во-вторых, динамика поствакцинального увеличения СГТ сывороточных и секретируемых IgG-антител имела сходный характер. Отличия включали следующие три параметра: (i) СГТ сывороточных IgA-антител значительно превосходили СГТ секретируемых антител того же класса; (ii) пиковое значение СГТ секретируемых IgA-антител наблюдалось на 7-й день после первой прививки, и в последующем их уровень снижался, несмотря на повторную иммунизацию. Пик же СГТ сывороточных IgA-антител отмечен позже — на 28-й день после первичной вакцинации, и после второй прививки их концентрация не менялась; (iii) в предвакцинальный период (Д0) СГТ сывороточных IgA-, и особенно IgG-антител был существенно выше СГТ секретируемых антител аналогичных классов ($p < 0,05$; $< 0,001$). Обращает на себя внимание также то, что перечисленные сходства и отличия относились в равной степени к данным с вакцинным вирусом А (H5N1) и гетеросубтипическим вирусом А(H5N2). Однако во всех временных интервалах СГТ сывороточных IgA- и IgG-антител к вирусу А (H5N2) имели более высокое значение ($p < 0,01$; $< 0,001$), тогда как уровень секретируемых антител обоих классов к гомологичному и гетерологичному вирусам существенно не отличался ($p > 0,05$).

Данные таблицы 1 отражают анализ изучаемого вопроса по другому показателю — числу (%) поствакцинальных конверсий сывороточных и секретируемых антител.

После двухкратной иммунизации (Д56) этот показатель в отношении секретируемых IgG-антител (ИФА) и сывороточных антигемагглютинирующих антител (РТГА) были весьма высоки: 74-84% конверсий. Несколько реже фиксировались конверсии сывороточных IgG-антител: 53-57% ($p < 0,05$). Показатели конверсий секретируемых IgA-антител составляли всего 26% ($p < 0,001$). Однако на раннем сроке после первичной вакцинации (Д7) наблюдалась иная ситуация. В этой точке наибольшее число конверсий зафиксировано в надосадках культур МПК (57-74%), тогда как аналогичный показатель для сывороточных антител составлял 16-47% ($p < 0,05$; $< 0,001$). Поэтому был проведен более детальный анализ иммуногенности ИГВ H5N1 по индивидуальным данным, полученным на раннем сроке антителогенеза (табл. 1).

В Д7 только 7 из 19 волонтеров (37%) ответили конверсиями сывороточных антигемагглютинирующих антител к вирусам гриппа А (H5N1) и/или А (H5N2), тогда как этот показатель в отношении секретируемых IgA- и/или IgG-антител составил 84% ($p < 0,001$). При этом у 8 из 19 человек (42%) отмечены конверсии только секретируемых антител при отсутствии таковых по данным РТГА. Иными словами, применение испытуемого теста значительно расширило сведения об индукции гуморального иммунного ответа на 7-й день после первой прививки. Причем общее количество конверсий секретируемых антител класса А и/или G в начальной (Д7) и конечной (Д56) точках исследования не отличались — соответственно, у 16 человек из 19 (84%) и у 16 человек из 19 (84%).

Таким образом, применение методики обнаружения антител в надосадках культур МПК не только обеспечивало дополнительную информацию по отношению к данным РТГА, но и давало возможность выявить уже на седьмой день после первичной вакцинации антителы иммунный ответ у подавляющего числа вакцинированных лиц (84%).

Если сравнивать сведения в Д7 о поствакцинальных гуморальных иммунных ответах секретируемых и сывороточных IgA- и IgG-антител, то в этом случае первые превосходили по частоте вторые. Это касалось продукции IgA- и особенно IgG-антител к вирусам А(H5N1) и А(H5N2): по 74% конверсий секретируемых IgA-антител и по 47% конверсий сывороточных антител того же класса ($p < 0,05$); соответственно, 58 и 47% секретируемых и 26 и 16% сывороточных IgG-антител ($p < 0,01$). При этом присовокупление к данным *in vitro* (секретируемые антитела), результатов *in vivo* (сывороточные антитела) практически не увеличило число поствакцинальных конверсий (соответственно, 84 и 90%, $p > 0,05$).

Таким образом, в Д7 испытуемый тест имел преимущество в исследовании иммуногенности ИГВ H5N1 не только в РТГА, но и в ИФА — сывороточные антитела.

Обсуждение

Циркулирующие сывороточные и секретируемые антитела отличаются по качественному составу. Так, после введения вакцины различными путями наивные В-клетки и В-клетки памяти активируются в сайте аппликации препарата и в дренажных лимфатических узлах. Активированные клетки пролиферируют и дифференциру-

ются в плазмобласты в герминальных центрах локальных лимфоузлов. На 6–8 сутки после иммунизации большая часть плазмобластов покидают герминальные центры и уходят в циркуляцию в виде антиген-специфических антителосекретирующих В-клеток (АСК). В зависимости от антиген-презентирующих окружающих факторов они экспрессируют разные рецепторы траффика, которые и определяют их миграцию в те или иные регионы и ткани организма [10, 11]. Популяция клеток, мигрирующая в костный мозг, становится плазматическими клетками, секретирующими сывороточные антитела [4, 5]. Другие плазмобласты проникают в мукозальные сайты респираторного тракта и секретируют локальные антитела, принимающие прямое участие в нейтрализации возбудителя во входных воротах инфекции. Таким образом, исследование сыворотки крови дает представление о поствакцинальной продукции антител, секретирующихся только клетками костномозгового происхождения, тогда как В-клетки в культуре МПК секретируют *in vitro* все антитела вне зависимости от их ареала миграции. Кроме того, в данном случае выявляются антитела, проявляющие специфичность именно к вакцинному штамму, без учета воздействия количественных показателей иммунного ответа предсуществующих штаммоспецифических и перекрестно-реагирующих антител к консервативным иммуно-эпитопам вируса [9].

Нами установлено, что даже однократное введение праймированным волонтерам ИГВ, приготовленной из птичьего вируса А (H5N1), то есть сероподтипа, с которым они ранее не контактировали, индуцировало продукцию не только сывороточных IgA- и IgG-антител, но и секретируемых *in vitro* антител тех же классов. При этом наблюдались количественно-качественные отличия. Первое из них — СГТ обоих изотипов секретируемых антител были существенно ниже по сравнению с СГТ сывороточных антител (рис. 1). Скорее всего, это можно связать с тем, что в системе *in vitro* фиксировались чисто штаммоспецифические иммуноглобулины без наложения кросс-реактивных антител, выявляемых в ИФА при исследовании сывороток крови. Второе отличие касалось динамических изменений СГТ IgA-антител, пик которых в надосадках МПК наблюдался на раннем сроке после первой прививки (Д7), а в сыворотках крови — значительно позже (Д28). Аналогичная закономерность отмечена и американскими авторами при испытании сезонной ИГВ [8, 9]. Вполне веро-

ятно, что это объясняется той же причиной — выявление в двух сравниваемых тестах разных пулов IgA-антител, а именно: в случае с сывороточными антителами — преимущественно кросс-реактивных, а в системе *in vitro* — штаммоспецифических. При этом продукция кросс-реактивных сывороточных антител происходила по вторичному типу иммунного ответа, а секретируемых *in vitro* — по первичному, характеризующемуся более ранним накоплением IgA-антител по сравнению с IgG-антителами [4].

Обращает на себя внимание почти полная идентичность в динамике развития у волонтеров гуморального иммунного ответа к вакцинному вирусу А (H5N1) и гетеросубтипическому вирусу А (H5N2) — рисунок 1. Данный феномен можно интерпретировать по двум позициям. Первая из них — оба вируса имеют общий гемагглютинин H5, к которому продуцировались как сывороточные, так и секретируемые антитела. Вторая позиция — следует учитывать, что у людей, вакцинируемых ИГВ H5N1, формировалась В-клеточная иммунологическая память к вирусу А (H5N2) после предшествующей (1,5 года назад) вакцинации ЖГВ H5N2. Поэтому у участвовавших в нашем исследовании праймированных волонтеров интенсивность накопления сывороточных антител к праймирующему вирусу А (H5N2) оказалась выше, чем к вакцинному вирусу А (H5N1), с которым они встретились впервые. Необходимо отметить значительный бустирующий эффект ИГВ H5N1 у праймированных ЖГВ H5N2 волонтеров, в отношении продукции сывороточных антител к вирусу H5N1, поскольку, как показано нами ранее, у непримированных волонтеров синтез этих антител, в ответ на двойную инокуляцию ИГВ H5N1, оказался весьма низким [13]. Однако количественные показатели (СГТ) секретируемых антител к обоим вирусам практически не отличались, поскольку, скорее всего, они проявляли специфичность только к общему гемагглютинину H5, без «наслоения» кросс-реактивных антител к консервативным белковым структурам вируса, выявляемым при исследовании в ИФА сывороточных антител. Данный феномен является еще одним доказательством качественного отличия секретируемых и сывороточных антител, выявляемых в ИФА.

На сегодняшний день иммуногенность гриппозных вакцин оценивается в единственном регламентированном тесте (РТГА) по числу поствакцинальных конверсий у привитых сывороточных антигемагглютинирующих ан-

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА КОНВЕРСИЙ АНТИТЕЛ У ВОЛОНТЕРОВ, ПРИВИТЫХ ИГВ H5N1

Биологические материалы	Антитела	Число (%) поствакцинальных конверсий антител у волонтеров (N = 19)					
		Вакцинный вирус А (H5N1)			Гетеросубтипический праймирующий вирус А (H5N2)		
		II-I* (Д7)	III-I* (Д28)	IV-I* (Д56)	II-I* (Д7)	III-I* (Д28)	IV-I* (Д56)
Надосадки культур МПК	ИФА IgA	14 (73,7%)	8 (42,1%)	5 (26,3%)	14 (73,7%)	6 (31,6%)	5 (26,3%)
	ИФА IgG	11 (57,9%)	13 (68,4%)	16 (84,2%)	9 (47,4%)	11 (57,9%)	14 (73,7%)
Сыворотки крови	ИФА IgA	9 (47,4%)	15 (78,9%)	15 (78,9%)	9 (47,4%)	13 (68,4%)	13 (68,4%)
	ИФА IgG	5 (26,3%)	11 (57,9%)	11 (57,9%)	3 (15,8%)	9 (47,4%)	10 (52,5%)
	РТГА	5 (26,3%)	11 (57,9%)	14 (73,7%)	5 (26,3%)	14 (73,7%)	14 (73,7%)

Примечание. * II-I – через 7 дней после 1-й прививки (Д7); III-I – через 28 дней после 1-й прививки (Д28); IV-I – через 28 дней после 2-й прививки (Д56).

тител через 28-30 дней после вакцинации [12]. Однако такой подход далеко не полностью отражает способность вакцин (особенно живых) индуцировать адаптивный гуморальный иммунитет [2, 3, 9]. Поэтому почти все исследователи новых гриппозных вакцин, помимо РТГА, используют ИФА для определения сывороточных и локальных антител. В этой связи мы проанализировали в сравнительном плане частоту (%) конверсий сывороточных и секретируемых антител после вакцинации волонтеров ИГВ H5N1.

Установлено (табл. 2), что двукратная прививка данной вакциной (Д56) индуцировала наибольшее число конверсий сывороточных IgA-антител и сывороточных антигеммагглютинирующих антител, более низкое – сывороточных IgG-антител и очень низкое – секретируемых IgA-антител. Однако на раннем сроке после первой прививки (табл. 1), наоборот, суммарное число конверсий секретируемых антител класса А и/или G оказалось самым высоким (84%), по сравнению с конверсиями сывороточных (68%) и особенно антигеммагглютинирующих антител (26%). В большей степени данное преимущество касалось выявления в ИФА секретируемых IgG-антител (58% конверсий), по сравнению с сывороточными IgG-антителами (16-26% конверсий). Но самое важное заключалось в том, что использование теста *in vitro* позволило составить полное представление об иммуногенности H5N1 уже на седьмой день после первичной вакцинации (84% конверсий), поскольку в этом плане последующие исследования в более отдаленные интервалы (Д28

и Д56) практически не добавили информации (те же 84% конверсий).

Резюмируя, можно сделать следующие выводы.

При бустировании волонтеров ИГВ H5N1 на фоне предшествовавшего праймирования ЖГВ H5N2 показано, что ИГВ H5N1 стимулировала продукцию не только сывороточных IgA- и IgG-антител, но и секрецию *in vitro* зрелыми В-клетками иммуноглобулинов тех же классов как к вакцинному А (H5N1), так и к гетеросубтипическому вирусу А (H5N2)

Поствакцинальный гуморальный иммунный ответ, фиксируемый в ИФА *in vitro*, отличается по ряду параметров от аналогичного ответа *in vivo*, то есть от данных определения в том же тесте сывороточных антител: более низкий уровень IgA- и IgG-антител, смещение пика секреции IgA-антител на ранний срок после первичной вакцинации. Все это в совокупности свидетельствует в пользу того, что *in vitro* выявляются преимущественно штаммоспецифические антитела, индуцированные непосредственно вакцинным вирусом, тогда как в тесте *in vivo* – главным образом, перекрестно-реагирующие сывороточные антитела к консервативным иммунодоминантным эпитопам вириона.

В сравнении с тестированием в РТГА и ИФА сывороточных антител испытанная методика имела преимущество в выявлении частоты поствакцинальных конверсий IgA- и особенно IgG-антител, констатируемых на раннем сроке после первичной вакцинации (7-й день). Эти данные позволили уже на этом этапе полностью оценить иммуногенность вакцины. Исследования в последующих временных интервалах (28 день после первой прививки и 28 день после второй

прививки) не дали дополнительной информации.

Перечисленное выше свидетельствует о возможности использования испытанной методики определения в ИФА секреции антител *in vitro* в качестве альтернативного приема оценки иммуногенности гриппозных вакцин, дающего более

точное и полное представление об антительном иммунном ответе непосредственно к штамму — индуктору антителогенеза.

Дополнительно выявлен бустлирующий эффект в отношении продукции сывороточных антител к вакцинному вирусу А (H5N1) у людей, праймированных полтора года назад ЖГВ (H5N2).

Список литературы / References

1. Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Кузнецова С.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Локальный и гуморальный иммунный ответ у больных гриппом и у лиц, привитых против сезонных и пандемических вирусов гриппа А // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 3. С. 37-42. [Donina S.A., Petukhova G.D., Korenikov D.A., Grigorieva E.P., Kuznetsova S.A., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Local Antibody Immune Responses in Influenza Patients and Persons Vaccinated with Seasonal, Pre-pandemic, and Pandemic Live Attenuated Influenza Vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 3, pp. 37-42. (In Russ.)]
2. Найхин А.Н., Артемьева С.А., Выборных Е.Н., Попова Т.Л., Каторгина Л.Г., Ким Т.Н., Кустикова Ю.Г., Денисов Г.М. Роль функциональной активности антител в защищенности людей от гриппа // Вопросы вирусологии, 1991. Т. 36, № 3. С. 194-197. [Naikhin A.N., Artemyeva S.A., Vybornykh E.N., Popova T.L., Katorgina L.G., Kim T.N., Kustikova Yu.G., Denisov G.M. The role of antibody functional activity in the protection of people against influenza. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 1991, Vol. 36, no. 3, pp. 194-197. (In Russ.)]
3. Найхин А.Н. Гетеросубтипический иммунитет к вирусам гриппа А: эпидемиологические данные, вовлеченность разных иммунологических факторов, вакцинация // Вопросы вирусологии, 2012. Т. 57, № 3. С. 4-9. [Naikhin A.N. Heterosubtypic immunity to influenza A viruses: epidemiological data, involvement of different immunological factors, vaccination. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2012, Vol. 57, no. 3, pp. 4-9. (In Russ.)]
4. Ярилин А.А. Иммунология: учебник. М.: Гэотар Медиа, 2010. 749 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 749 p.
5. Benner R., Hijmans W., Haaijman J.J. The bone marrow: the major source of serum immunoglobulins, but still a neglected site of antibody formation. *Clin. Exp. Immunol.*, 1981, Vol. 46, no. 1, pp. 1-8.
6. Cox R.J., Brokstad K.A., Zuckerman M.A., Wood J.M., Haaheim L.R., Oxford J.S. An early humoral immune response in peripheral blood following parenteral inactivated influenza vaccination. *Vaccine*, 1994, Vol. 12, no. 11, pp. 993-999.
7. Ershler W.B., Moore A.L., Hacker M.P. Specific *in vivo* and *in vitro* antibody response to tetanus toxoid immunization. *Clin. Exp. Immunol.*, 1982, Vol. 49, no. 3, pp. 552-558.
8. Ershler W.B., Coe C.L., Gravenstein S., Schultz K.T., Klopp R.G. Specific antibody synthesis *in vitro*. IV. The correlation of *in vitro* and *in vivo* antibody response to influenza vaccine in rhesus monkeys. *Clin. Exp. Immunol.*, 1988, Vol. 73, no. 3, pp. 355-3659.
9. He X.S., Sasaki S., Narvaez C.F. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *Journal of Immunological Methods*, 2011, Vol. 365, pp. 67-75.
10. Kunkel E.J., Butcher E.C.. Chemokines and the tissue-specific migration of lymphocytes. *Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 1, pp. 1-4.
11. Kunkel E.J., Butcher E.C. Plasma-cell homing. *Nat. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 3, no. 10, pp. 822-829.
12. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J. Detection of antibody to avian influenza A(H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assay. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, Vol. 37, pp. 937-943.
13. Rudenko L., Naykhin A., Donina S. Assessment of immune responses to H5N1 inactivated influenza vaccine among individuals previously primed with H5N2 live attenuated influenza vaccine. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2015 [in print].
14. Qadri F., Ryan E.T., Faruque A.S., Ahmed F., Khan A.I., Islam M.M., Akramuzzaman S.M., Sack D.A., Calderwood S.B. Antigen-specific immunoglobulin A antibodies secreted from circulating B cells are an effective marker for recent local immune responses in patients with cholera: comparison to antibody-secreting cell responses and other immunological markers. *Infect. Immun.*, 2003, Vol. 71, no. 8, pp. 4808-4814.
15. Sheikh A., Bhuiyan M.S., Khanam F., Chowdhury F., Saha A., Ahmed D., Jamil K.M., LaRocque R.C., Harris J.B., Ahmad M.M., Charles R., Brooks W.A., Calderwood S.B., Cravioto A., Ryan E.T., Qadri F. Salmonella

enterica serovar Typhi-specific immunoglobulin A antibody responses in plasma and antibody in lymphocyte supernatant specimens in Bangladeshi patients with suspected typhoid fever. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2009, Vol. 16, no. 11, 1587-1594.

16. Treanor J., Wright P.F. Immune correlates of protection against influenza in the human challenge model. *Dev. Biol. (Basel)*, 2003, Vol. 115, pp. 97-104.

Авторы:

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

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

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

Ерофеева М.К. — д.м.н., заведующая лабораторией испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Руденко Л.Г. — д.м.н., профессор, руководитель отдела вирусологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Losev I.V., Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Donina S.A., PhD (Medicine), Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Erofeeva M.K., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Trials of Novel Antiviral Remedies, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Rudenko L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 20.10.2015
Принята к печати 04.12.2015

Received 20.10.2015
Accepted 04.12.2015

ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ мРНК СПЛАЙСИРОВАННЫХ ВАРИАНТОВ DR3 В КРОВИ ПРИ ИНФЕКЦИОННОМ МОНОНУКЛЕОЗЕ

Цветкова В.Д.¹, Сахарнов Н.А.¹, Князев Д.И.¹, Уткин О.В.^{1,2},
Неумоина Н.В.¹, Бруснигина Н.Ф.¹

¹ ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

² ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ,
г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. «Рецептор смерти» DR3 играет важную роль в инициации апоптоза, пролиферации или воспаления. Показано участие данного рецептора в различных заболеваниях, в том числе инфекционной природы. В результате альтернативного сплайсинга образуется множество вариантов мРНК DR3, кодирующих мембранные и растворимые формы рецептора с различными функциями. Особенности экспрессии, а также вклад отдельных вариантов DR3 в иммунопатогенез инфекционного мононуклеоза (ИМ) практически не изучены.

Целью настоящей работы явилась разработка, валидация и апробация способов оценки уровня экспрессии и встречаемости сплайсированных вариантов мРНК DR3 в крови с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и ОТ-ПЦР при ИМ.

Разработанный вариант ОТ-ПЦР-РВ позволил специфично и чувствительно (лимит полуколичественной детекции = 34–35 циклов) определять относительное количество мРНК пула форм DR3, мембранных вариантов DR3 (LARD1a + LARD8), а также долю мРНК мембранных и растворимых форм рецептора у здоровых волонтеров и пациентов с острым инфекционным мононуклеозом (ОИМ). Показана низкая экспрессия в крови мРНК двух альтернативных мембранных вариантов DR3 – LARD1b и DR3beta, что позволяет отнести данные варианты к минорным формам. Обнаружено снижение относительного уровня экспрессии мРНК пула форм DR3 у пациентов с ОИМ по сравнению с условно здоровыми волонтерами на фоне отсутствия различий в экспрессии мРНК мембранных вариантов рецептора.

Для определения качественного вклада в экспрессию мембранных вариантов каждой из форм LARD1a и LARD8 был разработан двухраундовый «гнездовой» вариант ОТ-ПЦР. Показано, что в большинстве образцов здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ в экспрессию мРНК мембранных вариантов DR3 вносят свой вклад как основная мембранная LARD1a, так и альтернативная LARD8 формы рецептора.

Адрес для переписки:

Цветкова Вера Дмитриевна
ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский
институт эпидемиологии и микробиологии
им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора
603950, Россия, г. Нижний Новгород,
ул. Малая Ямская, 71.
Тел.: 8 (831) 469-79-46.
E-mail: starikova@nniiem.ru

Address for correspondence:

Cvetkova Vera D.
I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and
Microbiology
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Malaya Yamskaya str., 71.
Phone: 7 (831) 469-79-46.
E-mail: starikova@nniiem.ru

Образец цитирования:

В.Д. Цветкова, Н.А. Сахарнов, Д.И. Князев,
О.В. Уткин, Н.В. Неумоина, Н.Ф. Бруснигина,
«Определение уровня экспрессии мРНК сплайсированных
вариантов DR3 в крови при инфекционном
мононуклеозе» // Медицинская иммунология, 2016.
Т. 18, № 2. С. 139–150.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-139-150

© Цветкова В.Д. и соавт., 2016

For citation:

V.D. Cvetkova, N.A. Sakharov, D.I. Knyazev, O.V. Utkin,
N.V. Neumoina, N.F. Brusnigina, “Determination of level
expression of mRNA splicing variants for DR3 in blood cells in
infectious mononucleosis”,
Medical Immunology (Russia) Meditsinskaya Immunologiya, 2016,
Vol. 18, no. 2, pp. 139–150.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-139-150

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-139-150>

Разработанные способы оценки уровня экспрессии и встречаемости мРНК DR3 позволяют комплексно охарактеризовать изменения в экспрессии и функционировании данного рецептора, вызванные ИМ. В рамках развития данной работы требуется дальнейшая апробация методики на выборках большего объема.

Ключевые слова: DR3/LARD, альтернативный сплайсинг, сплайсированные варианты, инфекционный мононуклеоз, ПЦР в реальном времени

DETERMINATION OF LEVEL EXPRESSION OF mRNA SPLICING VARIANTS FOR DR3 IN BLOOD CELLS IN INFECTIOUS MONONUCLEOSIS

Cvetkova V.D.^a, Sakharov N.A.^a, Knyazev D.I.^a, Utkin O.V.^{a,b},
Neumoina N.V.^a, Brusnigina N.F.^a

^a I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. The DR3 «death receptor» plays an important role in the initiation of apoptosis, proliferation, or inflammation. This receptor is shown to be involved in various diseases, including infectious conditions. Different variants of mRNA DR3 are formed as a result of alternative splicing. These variant transcripts encode membrane and soluble forms of the receptor which have different functions. Features of their expression and contribution of individual DR3 variants to the immune pathogenesis of infectious mononucleosis (IM) are poorly understood.

The purpose of this work was to develop, validate and test the techniques of DR3 gene expression assays, as well as to evaluate the DR3 mRNA splice variants by means of real-time RT-PCR and RT-PCR in the IM patients.

The original version of real-time RT-PCR allowed to determine relative amounts of DR3 mRNA, DR3 membrane variants (LARD1a + LARD8), and ratios of mRNAs encoding membrane and soluble forms of the receptor. The technique proved to be specific and sensitive (a semi-quantitative detection limit = 34–35 cycles) when tested in healthy volunteers and patients with acute infectious mononucleosis (AIM). Lower expression levels were shown for two alternative membrane variants of DR3 mRNA (LARD1b and DR3beta) thus regarding these isoforms as minor fractions. The relative levels of total DR3 mRNA expression were decreased in patients with AIM, as compared to healthy volunteers, whereas mRNA expression of membrane receptor variants did not differ between IM and controls.

To determine a qualitative contribution of either LARD1a and LARD8 variants into the expression of membrane forms of DR3, a two-step «nested» version of RT-PCR has been developed. It was shown that, in majority of control and IM samples, both main LARD1a, and alternative LARD8 membrane forms are contributing to mRNA expression of membrane DR3 variants.

The presented methods for evaluation of expression and occurrence of DR3 mRNA variants allow to characterize changes in the expression and function of this receptor associated with infectious mononucleosis. Further investigations are required to test the technique in larger number of samples.

Keywords: DR3/LARD, alternative splicing, mRNA variants, infectious mononucleosis, real-time PCR

Введение

Трансмембранный белок второго типа DR3 (LARD) является одним из 8 членов семейства «рецепторов смерти», участвующих в инициации апоптоза, пролиферации или воспаления [12]. DR3 экспрессируется преимущественно в селезенке, тимусе и лейкоцитах периферической крови (Т- и В-лимфоцитах, NK- и NKT-клетках, макрофагах) [8]. Описана важная роль данного рецептора как в регуляции иммунных реакций,

так и в развитии воспалительных, аутоиммунных, онкологических и инфекционных заболеваний [5, 7, 9, 10].

В результате альтернативного сплайсинга образуется 14 вариантов мРНК DR3. Из них 4 мРНК кодируют мембранные формы рецептора, 8 мРНК соответствуют растворимым аналогам DR3, а 2 мРНК являются некодирующими [1, 11]. Функции мембранных и растворимых вариантов DR3 различны: мембранные формы ре-

цептора передают сигналы внутрь клеток, тогда как их растворимые аналоги препятствуют распространению сигнала [4]. Такой функциональный антагонизм различных сплайсированных вариантов DR3 играет важную роль в созревании и дальнейшей работе иммунокомпетентных клеток. Например, повышенная экспрессия некоторых растворимых вариантов в наивных Т-клетках защищает их от апоптоза, в то время как активированные Т-клетки экспрессируют полноразмерную мембранную форму DR3 – LARD1a, контролирующую пролиферацию лимфоцитов после активации [3].

Основными возбудителями инфекционного мононуклеоза (ИМ) и мононуклеоз-подобного синдрома являются вирус Эпштейна–Барр (ВЭБ) и цитомегаловирус (ЦМВ). Важной особенностью данных вирусов является способность модулировать апоптоз и пролиферацию иммунокомпетентных клеток [15, 16]. Рецептор DR3 является одним из ключевых элементов сигнального каскада, с участием которого осуществляется такая модуляция. Так, в работе Twohig и соавт. показано, что инфицирование ЦМВ приводит к повышению экспрессии DR3 CD8⁺ цитотоксическими Т-лимфоцитами, что сопровождается усилением их пролиферации у мышей. При этом мыши, не экспрессирующие DR3, были более восприимчивы к ЦМВ-инфекции [14]. Вместе с тем особенности экспрессии и функциональной роли сплайсированных вариантов DR3 в иммунопатогенезе при ИМ ранее не исследовались. Одной из возможных причин является отсутствие методических подходов, позволяющих проводить дифференциальную детекцию отдельных вариантов мРНК DR3 и оценивать уровень их представленности.

Целью настоящей работы явилась разработка, валидация и апробация способов оценки уровня экспрессии, встречаемости сплайсированных вариантов мРНК DR3 в крови с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и ОТ-ПЦР при ИМ.

Материалы и методы

Исследуемые образцы

Материалом послужила цельная периферическая кровь пациентов с диагнозом «острый инфекционный мононуклеоз» (ОИМ) (n = 20). Контрольную группу составляли условно здоровые волонтеры (n = 20), у которых отсутствовали клинические и лабораторные признаки данного заболевания.

Экстракция нуклеиновых кислот

Выделение РНК/ДНК проводили с помощью набора МАГНО-сорб («ЦНИИЭ», Россия) на ро-

ботизированной станции выделения нуклеиновых кислот Xiril («Xiril», Швейцария). Каждый образец подвергали экстракции в 5 повторностях. Далее суммарную РНК отделяли от ДНК с помощью фенола (насыщенного ацетатом натрия, pH = 4,0) и хлороформа [6]. Полученную РНК концентрировали, переосаждая изопропанолом, ацетатом натрия (pH = 5,2) и гликогеном («Amresco», США) согласно рекомендации производителя. Осадок растворяли в 50 мкл воды I типа (Milli-Q) и хранили при -80 °С до использования. Концентрацию и чистоту выделенной суммарной РНК измеряли с помощью спектрофотометра BioPhotometer Plus («Eppendorf», Германия); чистота (A260/280) раствора РНК варьировала от 2,5 до 3.

Дизайн праймеров и зондов

Используемые праймеры и зонды были сконструированы с помощью бесплатного программного продукта Primer-blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) (табл. 1). Расчетная температура плавления всех праймеров равнялась 60 °С, что обеспечивает возможность амплификации целевых и референсных молекул в одной пробирке и при одинаковых условиях. Зонды подбирали таким образом, чтобы их температура плавления была выше минимум на 10 °С. Все праймеры и зонды синтезированы компанией «ДНК-синтез» (Россия).

Реакция обратной транскрипции

Для синтеза кДНК на матрице мРНК проводили реакцию обратной транскрипции с использованием амплификатора MaxyGene Gradient («Axygen», США) и набора RevertAid Reverse Transcriptase («Thermo Scientific», США) согласно рекомендации производителя. Для дальнейшей постановки ПЦР в реальном времени использовали 9 аналогичных реакций ОТ с применением смеси праймеров DR3R8 и FPGSR, а для постановки двухраундовой ПЦР в реакцию ОТ добавляли праймер DR3TMR4 в концентрациях, указанных в таблице 1. В качестве матрицы использовали тотальную очищенную РНК (см. раздел «Экстракция нуклеиновых кислот») в количестве 5 мкг. Постановку контрольной реакции по-RT (обратная транскрипция без фермента обратной транскриптазы) выполняли аналогичным способом, но вместо обратной транскриптазы добавляли воду I типа (Milli-Q). Синтезированную кДНК очищали от компонентов ОТ-буфера, высаживая изопропанолом в присутствии гликогена («Amresco», США). Осадок растворяли в 45 и 100 мкл воды I типа (для постановки реакции ПЦР-РВ и двухраундовой ПЦР соответственно).

Постановка ПЦР в реальном времени

Определение относительного уровня экспрессии мРНК пула мембранных и растворимых

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ И TaqMan зонды для ОТ-ПЦР и ОТ-ПЦР в РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

Назначение	Целевой ген	Название	Последовательность (5'–3')	Концентрация	Позиция	Размер ампликона (н.о.)
ОТ-ПЦР в реальном времени						
ОТ	DR3	DR3R8	CGCAGCAGCGGGGCCAAGA	1000 нМ	1009-1027 ¹ ; 874-892 ² ; 924-942 ³ ; 1036-1054 ⁴	-
	FPGS	FPGSR	ACCACAGGCTTCCTGATGATG	1000 нМ	683-703 ⁵	-
ПЦР-РВ (мРНК пула форм DR3)	DR3	DR3F9ex	CCGTCCAGTTGGTGGGTAAC	400 нМ	906-925 ¹	119
		DR3R9	AGCAGCGGGGCCAAGA	160 нМ	1009-1024 ¹	
		DR3PuIRZ	FAM-CTCTGCCCCGACGGTGACATGGTCTCTG-BHQ-1	200 нМ	962-987 ¹	
ПЦР-РВ (мРНК LARD1a+ LARD8)	DR3	DR3F6/7ex	CTGGAGGCAGATGTTCTGG	400 нМ	676-694 ¹ ; 541-559 ²	133
		DR3RM1	CCCAGCTTCATCTGCAGTAAC	200 нМ	788-808 ¹ ; 653-673 ²	
		DR3MgeneralZ	FAM-CAGCAGTGGCGGTATGTGTAGGTCA-BHQ-1	200 нМ	747-771 ¹ ; 612-636 ²	
ПЦР-РВ (мРНК LARD1b)	DR3	DR3F6/7ex	CTGGAGGCAGATGTTCTGG	400 нМ	588-606 ³	133
		DR3RM2	AGCTTCATCTGCTGCAGTAAC	400 нМ	700-720 ³	
		DR3MgeneralZ	FAM-CAGCAGTGGCGGTATGTGTAGGTCA-BHQ-1	200 нМ	659-683 ³	

Таблица 1 (окончание)

Назначение	Целевой ген	Название	Последовательность (5'–3')	Концентрация	Позиция	Размер ампликона (н.о.)
ПЦР-PB (мРНК DR3β)	DR3	DR3Fbeta	GGAGGCAGAGTAGGTGTGTTCC	400 нМ	698-718 ⁴	138
		DR3RM1	CCCAGCTTCATCTGCAGTAAC	400 нМ	815-835 ⁴	
		DR3MgeneralZ	FAM-CAGCAGTGGCGGTATGTGTAGGTCA-BHQ-1	200 нМ	774-798 ⁴	
ПЦР-PB (мРНК FPGS)	FPGS	FPGSF	ATGGCCTGAAGACGGGATTTC	200 нМ	412-431 ⁵	154
		FPGSR2	ACACAGCTGCCATCC TTGGT	200 нМ	546-565 ⁵	
		FPGSZ	ROX-CAgTCCTgAgCTCTTTCACCAAgTACTT-BHQ-2	100 нМ	491-517 ⁵	
ОТ-ПЦР						
ОТ	DR3	DR3TMR4	CCCAGCTTCATCTGCAGTAA	2000 нМ	789-808 ¹ 654-673 ²	-
I раунд ПЦР	DR3	DR3F0	GTGACTTCCACAAGAAGATT	400 нМ	198-217 ^{1,2}	611 – для LARD1a; 614 – для LARD8
		DR3TMR4	CCCAGCTTCATCTGCAGTAA	400 нМ	789-808 ¹ 654-673 ²	
II раунд ПЦР (мРНК LARD1a)	DR3	DR3FLARD1A	TGATGAGCAGGGCCTCCCCAG	400 нМ	373-391 ¹	328
		DR3R10	CTGGACCCAGAACATCTGCC	400 нМ	681-700 ¹	
II раунд ПЦР (мРНК LARD8)	DR3	DR3FLARD8	CCCAGCGGCCTCCCA	400 нМ	241-255 ²	325
		DR3R10	CTGGACCCAGAACATCTGCC	400 нМ	546-565 ²	

Примечание. 1 – позиция в последовательности NCBI с номером NM_003790.2; соответствует основной полноразмерной форме мРНК DR3 – LARD1a.
2 – позиция в последовательности NCBI с номером NM_148967.1; соответствует альтернативной мембранной форме мРНК DR3 – LARD8.
3 – позиция в последовательности NCBI с номером U94502.1; соответствует альтернативной мембранной форме мРНК DR3 – LARD1b.
4 – позиция в последовательности NCBI с номером NM_148965.1; соответствует альтернативной мембранной форме мРНК DR3 – DR3β.
5 – позиция в последовательности NCBI с номером NM_004957.5; соответствует основной полноразмерной форме мРНК FPGS – изоформа 1.

вариантов DR3, мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8, LARD1b, DR3beta осуществляли с помощью мультиплексной реакции ПЦР-РВ в отдельных пробирках. В качестве нормализатора использовали ген FPGS, обладающий стабильной экспрессией в клетках периферической крови [13]. В состав реакционной смеси объемом 25 мкл входили следующие компоненты: 5-кратный ПЦР-буфер blue 15 mM Mg²⁺; 2,5 е.а. Taq-F ДНК-полимераза («ЦНИИЭ», Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,16 mM) («Силекс», Россия); праймеры и зонды в оптимизированных концентрациях, указанных в таблице 1; Hi-Di формамид (2% по объему) («Applied Biosystems», США) и 2 мкл целевой кДНК (около 2 мкг). Используемая оптимальная концентрация Hi-Di формамида позволяла повысить специфичность и выход ПЦР-продукта с богатым GC-составом без эффекта ингибирования реакции. Амплификацию специфичных фрагментов и детекцию результатов проводили на амплификаторе Rotor-Gene Q 5plex HRM («Qiagen», Германия). Температурный профиль ПЦР-реакции содержал стадию инициации денатурации и активации полимеразы на 94 °C в течение 15 мин, с последующим проведением 50 циклов (денатурация при 94 °C — 25 с; отжиг праймеров при 58 °C — 30 с; элонгация при 72 °C — 30 с). Детекцию уровней флуоресценции проводили в конце стадии отжига праймеров (58 °C-сегмент) по каналам FAM и ROX. Продукты ПЦР-РВ также были проанализированы с помощью электрофореза в 2% агарозном геле, содержащем бромид этидия (0,02% по объему).

Валидация ПЦР в реальном времени

Первоначально нами была проведена ПЦР-реакция целевых и референсного генов в отдельных пробирках. Для определения порогового цикла (Ct) каждой ПЦР-реакции устанавливали значение пороговой линии (на уровне начала линейного участка экспоненциальной фазы амплификации). Подбирали минимальную концентрацию праймеров, при которой наблюдалось низкое значение Ct, высокий уровень флуоресценции и наименьшее количество неспецифических продуктов по результатам электрофореза для каждой молекулы-мишени. Затем мы осуществляли одновременную амплификацию целевого и референсного генов в дуплексной реакции ПЦР и анализировали изменение Ct. По результатам были скорректированы концентрации праймеров таким образом, что значения Ct в мультиплексной реакции не отличались от аналогичных значений одиночных ПЦР-реакций.

Чтобы определить лимит полуколичественной детекции (ЛПКД) (граничное значение Ct, при

котором можно провести полуколичественную оценку экспрессии гена), мы построили стандартную кривую для каждой целевой молекулы, включающую в себя не менее 7-9 выборочных двукратных разведений концентрированной матрицы. Разведения были подобраны таким образом, чтобы значения их Ct выходили за рамки самого низкого уровня ожидаемой концентрации мишени в тестируемых образцах. Для каждой целевой молекулы было отобрано максимальное значение Ct, для которого не происходило значительного разброса значений в триplete (не более 0,5 цикла), и принимали его за ЛПКД.

Каждая ПЦР-постановка включала в себя триплеты тестируемых образцов и их разведений (4-кратных для пула форм DR3 (1); 2-кратных для мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8 (2)), а также отрицательный контроль. Результаты ПЦР-реакции считали достоверными, если разброс значений Ct в триplete составлял не более 0,5 цикла. Полученные средние значения Ct использовали для построения стандартной кривой. Эффективность ПЦР-реакции определяли по формуле: $E = 10^{-1/\text{slope}}$, где slope — тангенс угла наклона стандартной кривой.

Двухраундовая «гнездовая» ПЦР

Для отдельной качественной детекции мРНК LARD1a и LARD8 использовали двухраундовый «гнездовой» вариант ПЦР. Реакционная смесь (25 мкл) первого раунда ПЦР содержала 5-кратный ПЦР-буфер blue 15 mM Mg²⁺; 2,5 е.а. Taq-F ДНК-полимераза («ЦНИИЭ», Россия); смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов (до конечной концентрации 0,16 mM) («Силекс», Россия); прямой DR3F0 и обратный DR3TMR4 праймеры в концентрациях, указанных в таблице 1. В качестве матрицы использовалась очищенная целевая кДНК, в объеме 2 мкл на реакцию (около 0,1 мкг). Готовую реакционную смесь инкубировали 15 мин при 94 °C, проводили 30 циклов (94 °C — 30 с; 55 °C — 30 с; 72 °C — 40 с) амплификации и цикл достройки цепей 72 °C — 5 мин. Второй раунд ПЦР проводили в разных пробирках с использованием специфических пар праймеров для LARD1a или LARD8 (табл. 1). Помимо праймеров, в состав реакционной смеси также входили 5-кратный ПЦР-буфер, Taq-F ДНК-полимераза, смесь дезоксинуклеозидтрифосфатов, Hi-Di формамид (3% по объему) и 2 мкл продукта первого раунда ПЦР. Температурный профиль реакции включал в себя денатурацию при 94 °C — 15 мин, 25 циклов амплификации (94 °C — 25 с; 63,5 °C — 30 с; 72 °C — 30 с) с последующей инкубацией при 72 °C — 5 мин. Визуализацию результатов двух раундов ПЦР проводили с помощью электрофореза в 2% агарозном геле,

содержащем бромид этидия (0,02% по объему). Результаты детектировали на трансиллюминаторе InGenius 3 с использованием программного продукта GeneSys («Syngene», Великобритания).

Секвенирование продуктов ПЦР-реакции

Определение нуклеотидной последовательности продуктов ПЦР-РВ и двухраундовой «гнездовой» ПЦР проводили на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 («Applied Biosystems», США). Для этого вырезанные из 3% агарозного геля фрагменты кДНК очищали с помощью набора PureLink Quick Gel Extraction Kit («Invitrogen», США) и проводили реакцию терминирования с использованием набора BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit («Applied Biosystems», США) согласно рекомендации производителя. Полученные нуклеотидные последовательности сравнивали с последовательностями мРНК мембранных форм DR3 (NM_003790.2; NM_148967.1; U94502.1; NM_148965.1) и мРНК основной полноразмерной формы референсного гена FPGS (NM_004957.5), зарегистрированных в базе данных NCBI GenBank.

Обработка результатов

Относительное количество молекул-мишеней в каждой пробе рассчитывали по формуле: $\text{relative amount} = E_{\text{ref}}^{C_t} / E_{\text{targ}}^{C_t}$, где ref — ген-референт FPGS, targ — исследуемый ген DR3. Статистическую обработку результатов проводили с использованием статистических пакетов Microsoft Excel 2007 и Statistica 8.0. При сравнении двух групп в зависимости от типа данных применяли критерий Манна–Уитни или двусторонний тест точного критерия Фишера. Результаты по относительным уровням экспрессии мРНК пула форм и мембранных вариантов LARD1a + LARD8 указаны в виде медианы (Me) с интерквартильным размахом 25–75-й процентиля (Q25–Q75); данные по встречаемости мРНК отдельных вариантов LARD1b, DR3beta, LARD1a, LARD8 представлены в виде относительных частот. Статистически значимыми считали различия между группами при $p < 0,05$. Долю мРНК мембранных вариантов DR3 рассчитывали по формуле: $\text{Me (LARD1a + LARD8)} / \text{Me (пул форм DR3)}$; для определения доли мРНК растворимых вариантов рецептора из единицы вычитали долю мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8, где Me — медиана.

Результаты

Стратегия подбора праймеров

Рецептор DR3 характеризуется высокой гетерогенностью нуклеотидных последовательностей мРНК сплайсированных вариантов, что определяет трудности в подборе общих участков для по-

садки праймеров. Например, последовательность 7 экзона, кодирующая трансмембранный домен DR3, не является специфичной для мРНК мембранных форм. В связи с этим нами предложена следующая схема расположения пар праймеров в реакциях ОТ-ПЦР-РВ (рис. 1):

(1) Прямой DR3F9ex и обратный DR3R9 праймеры. Позволяют амплифицировать участок 9 экзона, общего для всех кодирующих форм мРНК DR3, и, таким образом, выявлять пул форм мРНК данного рецептора.

(2) Прямой DR3F6/7ex и обратный DR3RM1 праймеры. Позволяют детектировать мРНК двух мембранных вариантов: полноразмерного LARD1a и альтернативного LARD8.

(3) Прямой DR3F6/7ex и обратный DR3RM2 праймеры. С их помощью происходит наработка фрагмента, соответствующего альтернативному мембранному варианту LARD1b.

(4) Прямой DR3Fbeta и обратный DR3RM1 праймеры. Фланкируют фрагмент, специфичный для мРНК альтернативного мембранного варианта DR3beta.

Валидация ПЦР в реальном времени

Валидацию и оптимизацию реакций ОТ-ПЦР-РВ проводили в несколько этапов. Чтобы избежать амплификации фрагментов ДНК, праймеры располагали преимущественно на стыках «экзон–экзон». Отсутствие наработки геномной ДНК подтвердили, проводя контрольные реакции по-RT. С помощью свенирования нами была доказана специфичность амплифицируемых в реакциях ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР фрагментов.

Оптимальные значения пороговой линии были установлены на уровне 0,02 для ПЦР-реакций целевого гена DR3/LARD и 0,015 — для гена-нормализатора FPGS. По результатам экспериментальных триплетных постановок реакций ОТ-ПЦР-РВ (результаты не представлены) концентрации праймеров были скорректированы до следующих значений (табл. 1): 400 нМ DR3F9ex и 160 нМ DR3R9; 400 нМ DR3F6/7ex и 200 нМ DR3RM1; 400 нМ DR3F6/7ex и 400 нМ DR3RM2; 400 нМ DR3Fbeta и 400 нМ DR3RM1. Для амплификации гена FPGS в каждой дуплексной ПЦР-реакции использовали прямой FPGSF и обратный FPGSR2 праймеры в концентрациях по 200 нМ. В состав реакционной смеси также включали Hi-Di формамид в оптимальной концентрации (2% от объема ПЦР-смеси), повышающей специфичность и выход ПЦР-продукта без эффекта ингибирования реакции.

Для каждой целевой молекулы определяли лимит полуколичественной детекции (ЛПКД), отражающий предельную чувствительность полуколичественного определения экспрессии мРНК DR3 (рис. 2). В результате для мРНК

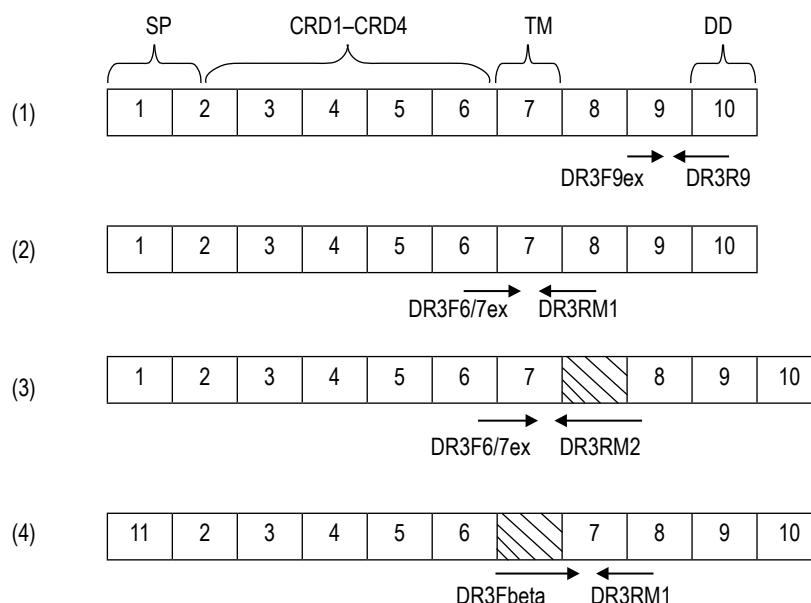


Рисунок 1. Схема расположения пар праймеров в реакциях ОТ-ПЦР-РВ

Примечание. SP – участок мРНК, кодирующий сигнальный пептид; CRD1-CRD4 – участок мРНК, кодирующий цистеин-обогащенные домены; TM – участок мРНК, кодирующий трансмембранный домен; DD – участок мРНК, кодирующий домен смерти.

Прямоугольниками с цифрами схематично изображены экзоны; заштрихованными прямоугольниками показаны нуклеотидные вставки в альтернативных сплайсированных вариантах мРНК; стрелками обозначены места посадки праймеров.

пула изоформ DR3 (при эффективности реакции 1,99) ЛПКД был равен 34,77 циклам (рис. 2А); аналогичное значение для мРНК мембранных вариантов LARD1a + LARD8(2) (при эффективности реакции 1,87) было равным 34,81 циклам (рис. 2Б). Таким образом, при *St* исследуемых мишеней меньше данных значений ЛПКД проводилась полуколичественная оценка экспрессии, тогда как при большем значении *St* делались выводы только о качественной детекции целевой молекулы. Показатели *St* мембранных вариантов LARD1b (3) и DR3beta (4), полученные на неразведенной концентрированной матрице, были ниже 35 циклов, поэтому для данных вариантов возможна только качественная оценка экспрессии мРНК.

Построение стандартной кривой и определение эффективности реакции

Для определения относительного уровня экспрессии мРНК пула форм DR3 (1) и мембранных форм LARD1a + LARD8 (2) осуществляли построение стандартной кривой с дальнейшим определением эффективности реакции (рис. 3). Использование различных (4- и 2-кратных) разведений для мишеней с высокой и низкой концентрацией позволяло сделать выводы о линейности диапазона амплификации в максимально широких рамках, но при этом не выходящих за ЛКД. Стандартные кривые исследуемых образцов показали значения коэффициента кор-

реляции R^2 не менее 0,985. Эффективность реакции как для мРНК пула форм DR3 (1), так и для мРНК некоторых мембранных вариантов (2) варьировала в пределах 1,75–2,05 от образца к образцу; в связи с этим мы осуществляли построение стандартной кривой и определение эффективности реакции для каждой тестируемой матрицы.

Анализ уровней экспрессии мРНК DR3 в образцах пациентов с ОИМ

Результаты исследования экспрессии мРНК DR3 и встречаемости отдельных форм мРНК рецептора с помощью разработанных вариантов методов ОТ-ПЦР-РВ и ОТ-ПЦР приведены в таблице 2. Так как низкая экспрессия мРНК мембранных вариантов LARD1b и DR3beta позволила провести только качественную оценку данных параметров, за относительную экспрессию мРНК суммарного пула мембранных вариантов приняли уровень представленности мембранных вариантов мРНК LARD1a + LARD8. Нами было обнаружено снижение относительного уровня экспрессии мРНК пула форм DR3 у пациентов с ОИМ в 2,4 раза по сравнению с условно здоровыми волонтерами ($p = 0,004$) на фоне неизменной экспрессии мембранных вариантов рецептора. При этом изменяется соотношение экспрессии мембранных/растворимых вариантов DR3: доля мРНК мембранных вариантов рецептора у пациентов с ОИМ значительно повы-

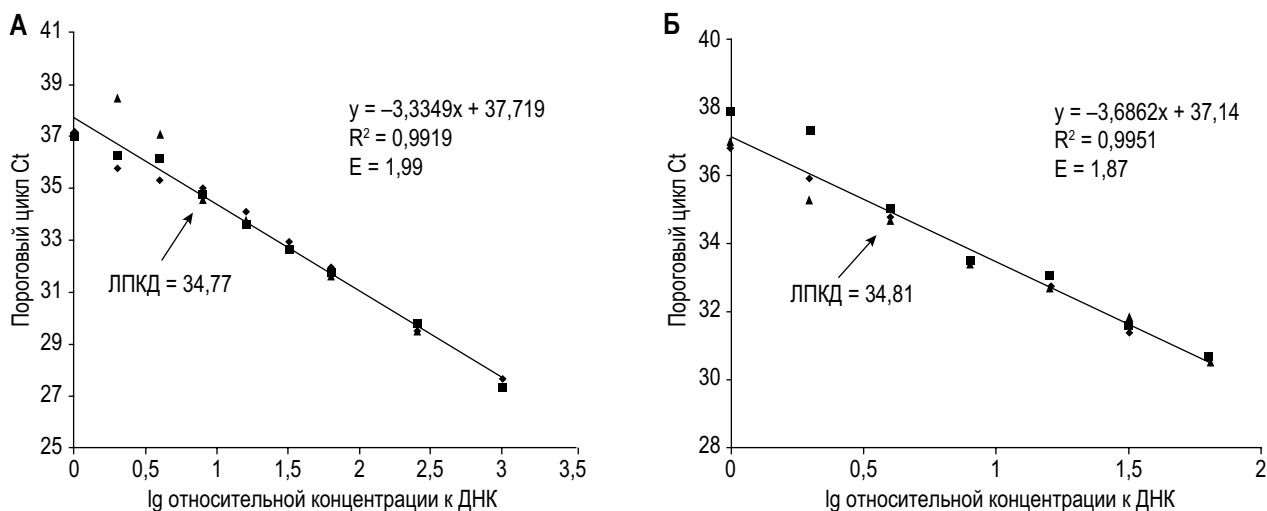


Рисунок 2. Стандартные кривые для определения лимита полуколичественной детекции (ЛПКД) мРНК пула изоформ DR3 (А) и мембранных вариантов LARD1a + LARD8 (Б)

Примечание. Значения лимита полуколичественной детекции (ЛПКД), эффективности (Е) и коэффициента детерминации (R^2) указаны на графике. Данные представлены в виде триплетных значений Ct для каждого разведения кДНК.

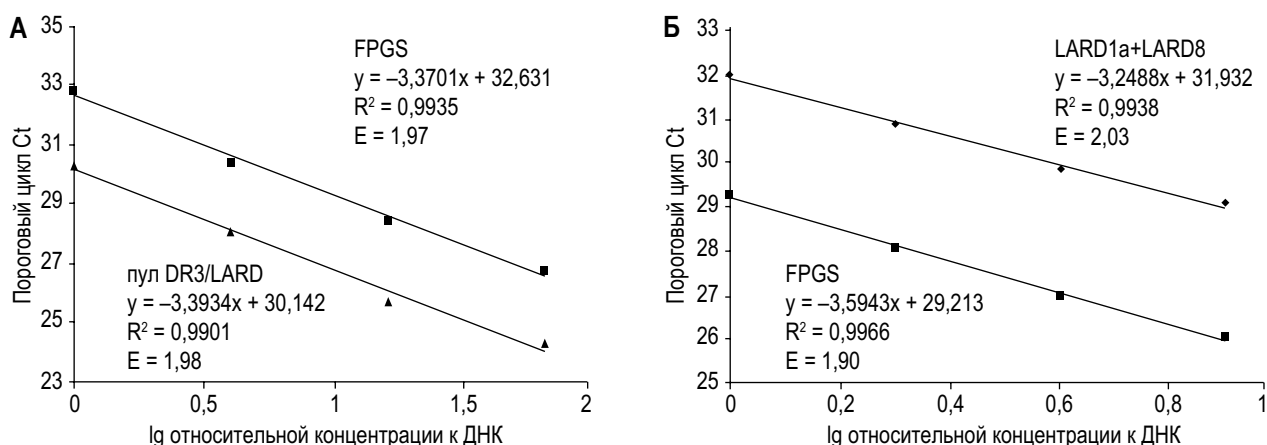


Рисунок 3. Построение стандартных кривых на основе 4-кратных разведений кДНК для пула изоформ DR3 (А) и 2-кратных разведений кДНК для мембранных вариантов LARD1a + LARD8 (Б) на примере одного из исследуемых образцов

Примечание. Исследуемые мишени представлены в виде: треугольник – пул DR3; ромб – LARD1a + LARD8; квадрат – FPGS. Значения эффективности (Е) и коэффициента детерминации (R^2) указаны на графике. Все точки представляют собой среднее значение Ct триплетной/дуплетной ПЦР-постановки каждого разведения.

шена (0,13 против 0,04; в 3,3 раза), тогда как доля мРНК растворимых вариантов несколько снижалась (0,87 против 0,96; в 1,1 раза).

При исследовании встречаемости мРНК отдельных мембранных вариантов в крови здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ в рамках данных выборок нами не было обнаружено статистически значимых изменений (табл. 2).

Обсуждение

По сравнению с рецепторами смерти FAS/CD95 и TNFR1 свойства и функции DR3/LARD изучены мало. Ограниченная преимуществен-

но лимфоидной тканью экспрессия данного рецептора предполагает возможную роль DR3 в регуляции иммунного ответа при различных заболеваниях, в том числе инфекционной природы. Так, была показана протективная роль DR3 при инфицировании мышей *Salmonella enterica Typhimurium*; активация рецептора способствовала усиленной продукции интерферонов Т-лимфоцитами и приводила к эффективному освобождению организма от бактерии [5]. У мышей с ЦМВ-инфекцией была обнаружена повышенная экспрессия DR3 CD8⁺Т-лимфоцитами, что также способствовало элиминации вируса

ТАБЛИЦА 2. ВСТРЕЧАЕМОСТЬ И ОТНОСИТЕЛЬНЫЙ УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ МРНК DR3 В КРОВИ УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ВОЛОНТЕРОВ И ПАЦИЕНТОВ С ОИМ

Исследуемые группы	Относительный уровень экспрессии мРНК; Me (Q25-Q75)		Доля мРНК мембранных вариантов (LARD1a + LARD8)	Доля мРНК растворимых вариантов	Встречаемость мРНК			
	Пул форм DR3	мембранные варианты LARD1a + LARD8			мембранный вариант LARD1b	мембранный вариант DR3 beta	мембранный вариант LARD1a	мембранный вариант LARD8
Условно здоровые волонтеры, n = 20	11,30 (10,80-20,60)	0,45 (0,08-0,80)	0,04	0,96	20/20	18/20	20/20	16/20
Пациенты с ОИМ, n = 20	4,66 (2,00-6,07)*	0,59 (0,11-0,80)	0,13	0,87	20/20	14/20	20/20	20/20

Примечание. * – p < 0,05 по сравнению с условно здоровыми волонтерами.

из организма [14]. В свою очередь, нами было проведено предварительное исследование, направленное на изучение встречаемости мРНК некоторых альтернативных вариантов рецептора DR3 при герпесвирусной инфекции различной этиологии. При инфицировании вирусом ветряной оспы было обнаружено снижение встречаемости мРНК растворимого варианта DR3 soluble beta, ингибирующего передачу активационных сигналов, что может рассматриваться как один из путей ухода вируса от иммунологического контроля [2]. Таким образом, имеющиеся данные об участии рецептора DR3 в регуляции иммунного ответа при инфекционных заболеваниях чаще всего не учитывают функциональную гетерогенность различных (мембранных и растворимых) изоформ DR3.

Задача, решаемая в настоящей работе, заключалась в разработке и апробации способа определения уровня экспрессии и встречаемости сплайсированных вариантов мРНК DR3 в крови с помощью ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ) и ОТ-ПЦР при ИМ. Разработанный вариант ОТ-ПЦР-РВ позволил специфично и чувствительно (ЛПКД = 34-35 циклов) определять относительное количество мРНК пула кодирующих форм DR3 и мембранных вариантов LARD1a + LARD8. Впервые показана экспрессия в крови мРНК двух альтернативных мембранных вариантов DR3 – LARD1b и DR3beta. Тем не менее, в силу низкой экспрессии данные альтернативные варианты, по всей видимости, относятся к минорным формам и их вклад в экспрессию пула мРНК мембранных вариантов DR3 является незначительным. Таким образом, с помощью ОТ-ПЦР-РВ мы определяли относительное количество мРНК пула форм DR3, мембранных вариантов DR3 (LARD1a + LARD8), а также долю мРНК мембранных и растворимых форм рецептора у здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ. Обнаруженное снижение экспрессии мРНК пула кодирующих форм DR3 у пациентов с ОИМ предположительно происходило за счет падения экспрессии растворимых вариантов мРНК, что подтверждалось снижением доли мРНК растворимых форм рецептора. При этом закономерно возрастала доля мРНК мембранных вариантов DR3, указывающая на возможный рост функциональной роли этих вариантов рецептора при ОИМ.

Для определения качественного вклада в экспрессию мембранных вариантов LARD1a + LARD8 каждой из форм мы разработали двухраундовый гнездовой вариант ОТ-ПЦР. В результате обнаружено, что в большинстве об-

разцов здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ в экспрессию мРНК мембранных вариантов DR3 вносят свой вклад как основная мембранная LARD1a, так и альтернативная LARD8 формы рецептора. Отсутствие различий во встречаемости отдельных мембранных вариантов LARD1b, DR3beta, LARD1a и LARD8 между здоровыми волонтерами и пациентами с ОИМ может объясняться как малым объемом выборок, так и отсутствием изменений профиля продуктов альтернативного сплайсинга.

Таким образом, разработанные способы качественной и полуколичественной оценки экспрессии сплайсированных вариантов мРНК DR3 могут быть применены:

а) для оценки вклада отдельных изоформ DR3 и их групп в реализацию функций данного рецептора;

б) при изучении функциональных взаимосвязей DR3 с другими поверхностными рецепторами и элементами внутриклеточных сигнальных путей в различных типах клеток при широком спектре заболеваний.

В рамках развития данной пилотной работы нами планируется увеличить объем исследуемых выборок здоровых волонтеров и пациентов с ОИМ, а также оценить экспрессию мРНК DR3 в зависимости от этиологии, тяжести течения заболевания и других клинических и лабораторных показателей.

Список литературы / References

1. Уткин О.В., Новиков В.В. Рецепторы смерти в модуляции апоптоза // Успехи современной биологии, 2012. Т. 132, №4. С. 381-390. [Utkin O.V., Novikov V.V. Death receptors in modulation of apoptosis. *Uspekhi sovremennoy biologii = Biology Bulletin Reviews*, 2012, Vol. 132, no. 4, pp. 381-390. (In Russ.)]
2. Уткин О.В., Старикова В.Д., Новиков В.В. Встречаемость сплайсированных вариантов матричной РНК DR3/LARD при герпесвирусной инфекции // Вопросы вирусологии, 2014. Т. 59, № 6. С. 36-38. [Utkin O.V., Starikova V.D., Novikov V.V. Frequency of occurrence spliced variants of messenger RNA DR3/LARD at herpesviral infection. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2014, Vol. 59, no. 6, pp. 36-38. (In Russ.)]
3. Bamias G., Mishina M., Nyce M., Ross W.G., Kollias G., Rivera-Nieves J., Pizarro T.T., Cominelli F. Role of TL1A and its receptor DR3 in two models of chronic murine ileitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 22, pp. 8441-8446.
4. Borysenko C.W., A-Palacios V.N.G., Griswold R.D., Li Y., Iyer A.K., Yaroslavskiy B.B., Sharrow A.C., Blair H.C. Death Receptor-3 Mediates Apoptosis in Human Osteoblasts Under Narrowly Regulated Conditions. *J. Cell. Physiol.*, 2006, Vol. 209, no. 3, pp. 1021-1028.
5. Buchan S.L., Taraban V.Y., Slebiada T.J., James S., Cunningham A.F., Al-Shamkhani A. Death receptor 3 is essential for generating optimal protective CD4⁺ T-cell immunity against Salmonella. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 3, pp. 580-588.
6. Chomczynski P., Sacchi N. The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.*, 2006, Vol. 1, no. 2, pp. 581-585.
7. Meylan F., Richard A.C., Siegel R.M. TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 244, no. 1, pp. 188-196.
8. Pappu B.P., Borodovsky A., Zheng T.S., Yang X., Wu P., Dong X., Weng S., Browning B., Scott M.L., Ma L., Su L., Tian Q., Schneider P., Flavell R.A., Dong C., Burkly L.C. TL1A-DR3 interaction regulates Th17 cell function and Th17-mediated autoimmune disease. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 5, pp. 1049-1062.
9. Porquet N., Poirier A., Houle F., Pin A-L., Gout S., Tremblay P-L., Paquet E.R., Klinck R., Auger F.A., Huot J. Survival advantages conferred to colon cancer cells by E-selectin-induced activation of the PI3K-NFκB survival axis downstream of Death receptor-3. *BMC Cancer*, 2011, Vol. 11, p. 285.
10. Qin T. Upregulation of DR3 expression in CD4⁺ T cells promotes secretion of IL-17 in experimental autoimmune uveitis. *Mol. Vis.*, 2011, Vol. 17, pp. 3486-3493.
11. Screaton G.R., Xu X.N., Olsen A.L., Cowper A.E., Tan R., McMichael A.J. et al. LARD: A new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, Vol. 94, no. 9, pp. 4615-4619.
12. Sessler T., Healy S., Samali A., Szegezdi E. Structural determinants of DISC function: new insights into death receptor-mediated apoptosis signalling. *Pharmacol. Ther.*, 2013, Vol. 140, pp. 186-199.
13. Stamova B.S., Apperson M., Walker W.L., Tian Y., Xu H., Adamczyk P., Zhan X., Liu D.Z., Ander B.P., Liao I.H., Gregg J.P., Turner R.J., Jickling G., Lit L., Sharp F.R. Identification and validation of suitable endogenous reference genes for gene expression studies in human peripheral blood. *BMC Medical Genomics*, 2009, Vol. 2, p. 49.
14. Twohig J.P., Marsden M., Cuff S.M., Ferdinand J.R., Gallimore A.M., Perks W.V., Al-Shamkhani A., Humphreys I.R., Wang E.C. The death receptor 3/TL1A pathway is essential for efficient development of antiviral CD4⁺ and CD8⁺ T-cell immunity. *FASEB J.*, 2012, Vol. 26, no. 8, pp. 3575-3586.

15. Van de Berg P.J., Yong S.L., Remmerswaal E.B., van Lier R.A., ten Berge I.J. Cytomegalovirus-induced effector T cells cause endothelial cell damage. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2012, Vol. 19, no. 5, pp. 772-779.
16. Wang J.J., Li Y.F., Jin Y.Y. Wang X., Chen T.X. Effects of Epstein-Barr virus on the development of dendritic cells derived from cord blood monocytes: an essential role for apoptosis. *Braz. J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 16, no. 1, pp. 19-26.

Авторы:

Цветкова В.Д. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Сахарнов Н.А. — научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Князев Д.И. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Уткин О.В. — к.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биологии и биотехнологии ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора; ГБОУ ВПО «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Нижний Новгород, Россия

Неумоина Н.В. — к.м.н., главный врач клиники инфекционных болезней ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Бруснигина Н.Ф. — к.м.н., доцент, заведующий лабораторией метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Cvetkova V.D., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Sakharnov N.A., Research Associate, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Knyazev D.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Utkin O.V., PhD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology; Nizhny Novgorod State Medical Academy, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Neumoina N.V., PhD (Medicine), Medical Director, Clinics of Infectious Diseases, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Brusnigina N.F., PhD (Medicine), Associate Professor, Head, Laboratory of Metagenomics and Molecular Detection of Pathogens, I.N. Blokhina Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Nizhny Novgorod, Russian Federation

ЦИРКУЛИРУЮЩИЙ БЕЛОК MICA У БОЛЬНЫХ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫМИ ЛИМФОМАМИ

Клинова А.В.¹, Кузьмина Е.Г.², Абакушина Е.В.², Каневский Л.М.¹,
Неприна Г.С.², Павлов В.В.², Коваленко Е.И.¹

¹ ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

² Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

Резюме. Белок MICA — это стресс-индуцированный белок, который, как правило, не экспрессируется в здоровых тканях, однако появляется в большом количестве на поверхности клеток, подвергшихся опухолевой трансформации. В организме человека этот белок может как инициировать противоопухолевый иммунный ответ, так и способствовать ускользанию опухолевых клеток от уничтожения. В результате сбрасывания с поверхности опухолевых клеток растворимый белок MICA попадает в циркуляцию и способствует снижению активности эффекторных клеток за счет инактивации рецептора NKG2D. В данном исследовании была поставлена задача определить различия в концентрации циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови больных разными типами злокачественных лимфом и оценить влияние sMICA на NKG2D-позитивные цитотоксические лимфоциты. В экспериментальной модели с использованием клеточной линии C1R-MICA показан феномен сбрасывания MICA с поверхности культивируемых опухолевых клеток во внеклеточное пространство и продемонстрировано с помощью проточной цитометрии снижение экспрессии в мононуклеарах периферической крови рецептора NKG2D, зависимое от содержания sMICA в культуральной среде, что предполагает участие сывороточных молекул sMICA в супрессии противоопухолевого иммунного ответа. С помощью иммуноферментного метода проведен анализ содержания циркулирующего белка sMICA у больных с различными типами В-клеточных и Т-клеточной неходжкинскими лимфомами и выявлены группы пациентов с повышенным, по сравнению с контрольной группой, содержанием циркулирующего sMICA. Минимальное количество сывороточного sMICA было зарегистрировано в контрольной группе с медианой 20 пг/мл. В объединенной группе больных различными В-клеточными лимфомами было выявлено увеличение концентрации циркулирующего белка MICA более чем в 6,5 раз по сравнению с контрольной группой. При этом наиболее высокие значения sMICA были зарегистрированы в группах пациентов с хроническим лимфолейкозом, диффузной В-крупноклеточной лимфомой и множественной миеломой. Максимальное увеличение уровня растворимого белка sMICA среди исследованных групп больных наблюдалось в группе больных Т-клеточной анапластической лимфомой (медиана 574 пг/мл). В исследовании получены предварительные данные, свидетельствующие о супрессирующем влиянии разных компонентов (иммуно)полихимиотерапии, в част-

Адрес для переписки:

Коваленко Елена Ивановна
ФГБУН «Институт биоорганической химии
им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН
117997, Россия, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10.
Тел./факс: 8 (495) 330-40-11.
E-mail: lenkovalen@mail.ru

Address for correspondence:

Kovalenko Elena I.
Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry,
Russian Academy of Sciences
117997, Russian Federation, Moscow,
Miklukho-Maklaya str., 16/10.
Phone/Fax: 7 (495) 330-40-11.
E-mail: lenkovalen@mail.ru

Образец цитирования:

А.В. Клинова, Е.Г. Кузьмина, Е.В. Абакушина,
Л.М. Каневский, Г.С. Неприна, В.В. Павлов,
Е.И. Коваленко, «Циркулирующий белок MICA
у больных злокачественными лимфомами»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2.
С. 151–162. doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-151-162

© Клинова А.В. и соавт., 2016

For citation:

A.V. Klinkova, E.G. Kuzmina, E.V. Abakushina, L.M. Kanevskiy,
G.S. Neprina, V.V. Pavlov, E.I. Kovalenko, "Circulating
MICA protein in patients with malignant lymphomas", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18,
no. 2, pp. 151–162. doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-151-162

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-151-162>

ности ритуксимаба и лучевой терапии лимфом на уровень сывороточного sMICA. Таким образом, повышенный уровень sMICA у онкогематологических больных может явиться дополнительным основанием для применения противоопухолевой терапии, а мониторинг уровня sMICA на разных этапах лечения может оказаться полезен для оценки ее эффективности.

Ключевые слова: злокачественные лимфомы, лимфопролиферативные заболевания, белок MICA, sMICA, цитотоксические лимфоциты, рецептор NKG2D

CIRCULATING MICA PROTEIN IN PATIENTS WITH MALIGNANT LYMPHOMAS

Klinkova A.V.^a, Kuzmina E.G.^b, Abakushina E.V.^b, Kanevskiy L.M.^a, Neprina G.S.^b, Pavlov V.V.^b, Kovalenko E.I.^a

^a Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Abstract. MICA is a stress-induced protein that, as a rule, is not expressed in healthy tissues, but appears in large amounts on the surface of cells undergoing malignant transformation. In humans, this protein can either initiate antitumor immune response, or facilitate tumor cells for their escape of destruction. After shedding from tumor cell surface, soluble MICA enters blood circulation and contributes to decreased activity of effector cells, due to inactivation of NKG2D receptor. The aim of our study was to determine differences in circulating sMICA concentrations in sera of patients with different types of malignant lymphomas, and to evaluate the impact of sMICA upon NKG2D-positive cytotoxic lymphocytes. In experimental models with C1R-MICA cells, the MICA shedding was shown to occur from the surface of cultured tumor cells into the extracellular space. A reduced NKG2D expression dependent on sMICA concentration in the culture medium was demonstrated by flow cytometry in peripheral mononuclear cells, thus suggesting a role of serum sMICA in suppression of antitumor immune response. The sMICA detection was performed in patients with various types of B- or T-cell non-Hodgkin's lymphomas by means of enzyme-linked immunosorbent assay. The groups of patients with increased sMICA content were identified and compared with the control group. Minimal amounts of serum sMICA were registered in the control group, with the median of 20 pg/ml. In a combined group of patients with various B-cell lymphomas, an increase in circulating sMICA amounts was shown, at the levels of more than 6.5 times exceeding the control values. The highest values of sMICA were recorded among the patients with chronic lymphocytic leukemia, diffuse large cell lymphoma, and multiple myeloma. Maximal sMICA levels among the investigated groups of patients were observed in the group of patients with T-cell anaplastic lymphoma (median of 574 pg/ml). The study provides preliminary evidence for a suppressive effect of different (immuno)chemotherapy components, in particular, rituximab and radiation therapy, upon serum sMICA contents in the lymphoma patients. Thus, elevated serum sMICA levels in patients with hematological malignancies may be considered as an additional criterion for application of the antitumor therapy. sMICA monitoring at different stages of cytostatic treatment may be useful in order to evaluate its efficiency.

Keywords: malignant lymphomas, lymphoproliferative diseases, MICA protein, sMICA, cytotoxic lymphocytes, NKG2D receptor

Работа поддержана грантом РФФИ № 14-04-32342.

Список сокращений

Типы лимфом: БЛ — беркиттоподобная лимфома; ДБККЛ — диффузная В-крупноклеточная лимфома; ММ — множественная миелома; ТАЛ — Т-клеточная анапластическая лимфома; ФЛ — фолликулярная лимфома; ХЛЛ — хронический лимфолейкоз.

Типы терапии: ВДХТ — высокодозная химиотерапия; ЛТ — лучевая терапия; ПХТ — полихимиотерапия.

ФС — флударабин, циклофосфан; СОР — циклофосфан, винкристин, преднизолон; R-FC — ритуксимаб, флударабин, циклофосфан; R-СОР — ритуксимаб, циклофосфан, винкристин, преднизолон; R-СНОР — ритуксимаб, циклофосфан, доксорубин, винкристин, преднизолон; FMC — флударабин, митоксантрон, циклофосфан; СО — циклофосфан, винкристин.

Введение

Иммунная система участвует в распознавании и уничтожении поврежденных, в том числе опухолевых, клеток в организме. В свою очередь, опухолевые клетки используют многочисленные механизмы ухода от иммунного надзора. Показано, что белок MICA (MHC-I class-related protein A) обладает обеими возможностями: может служить инициатором противоопухолевого иммунного ответа, а также способствовать ускользанию опухолевых клеток от уничтожения [7]. Этот белок, как правило, не экспрессируется в здоровых тканях, однако появляется в большом количестве на поверхности пролиферирующих клеток, подвергшихся опухолевой трансформации [12, 13, 14].

Гликопротеин MICA с молекулярной массой около 43 кДа сходен по строению с белками главного комплекса гистосовместимости класса I: состоит из одной α -цепи с тремя внеклеточными доменами $\alpha 1$, $\alpha 2$ и $\alpha 3$, трансмембранным и цитоплазматическим участками [12, 21], однако не способен связывать $\beta 2$ -микроглобулин. Белок MICA кодируется высокополиморфным геном [6], для которого в настоящее время известно более 80 аллельных вариантов (<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>). Белок MICA распознается рецептором NKG2D (CD314), который экспрессируется в натуральных, или естественных, киллерах (NK-клетках), в $CD8^+$ $\alpha\beta$ и части $\gamma\delta$ Т-лимфоцитов [7, 13]. Мономер MICA связывается с гомодимером NKG2D, образуя комплекс [20], в результате чего в эффекторные клетки передается активирующий сигнал за счет ассоциации рецептора с адаптерным белком DAP10, содержащим активационный мотив YXXM [32]. Дальнейшая передача сигнала формирует каскад реакций, приводящий к индукции комплекса генов, связанных с цитолизом онкотрансформированных клеток-мишеней [8, 32]. Другими лигандами NKG2D у человека являются белок MICB и ряд белков семейства ULBP (UL16-binding protein), связывающих белок цитомегаловируса UL16 [8]. В NK-клетках связывание рецептора NKG2D с его лигандами достаточно для того, чтобы индуцировать активацию этих клеток, даже при наличии ингибирующих сигналов. В то же время в $CD8^+$ Т-клетках и $\gamma\delta$ Т-клетках такое взаимодействие оказывает только ко-стимулирующее действие [13]. Этот процесс является частью противоопухолевого иммунитета.

Показано, что для многих опухолей характерен феномен «сбрасывания» молекул MICA с поверхности клетки с образованием растворимой формы этого белка sMICA (soluble MICA) [28]. Молекулы sMICA практически отсутствуют в сы-

воротке крови здоровых людей, однако в значительных количествах обнаруживаются в образцах сыворотки крови больных со злокачественными новообразованиями солидного типа (карциномы желудочно-кишечного тракта, поджелудочной и молочной желез, печени, почек, легких, шейки матки, яичников, гипофиза, нейробластомы, меланомы, а также с различными формами лейкозов) [5, 3, 16, 18, 19, 22, 23, 26, 30]. Белок sMICA способен связываться с рецептором NKG2D, экспрессируемым эффекторными клетками, что приводит к их анергии посредством уменьшения экспрессии указанных рецепторов на клеточной поверхности и осложняет иммунотерапию онкологических заболеваний [15].

Опухоли гемопоэтической и лимфоидной тканей составляют значительную долю регистрируемых в человеческой популяции онкологических заболеваний, существенную часть их составляют злокачественные лимфомы. Всемирной организацией здравоохранения (ВОЗ) в 2008 г. в справочнике «Классификация ВОЗ опухолей гемопоэтической и лимфоидной тканей» [29] болезни лимфоидной ткани подразделяются на четыре группы: злокачественные образования лимфоидных предшественников, лимфома Ходжкина (ранее — лимфогранулематоз), зрелые В-клеточные лимфомы и зрелые Т-/NK-клеточные лимфомы. Последние две группы при объединении составляют большую группу неходжкинских лимфом.

В сыворотке крови больных с гематологическими опухолевыми заболеваниями многими исследователями регистрировалось увеличение содержания циркулирующего белка sMICA [10, 27]. Так, повышенный уровень sMICA наблюдался при различных типах лейкозов, в том числе при В-клеточном хроническом лимфолейкозе [17, 25], Т-клеточном гранулярном лимфолейкозе [31], лимфоцитоме кожи [9]. Ранее нами также был продемонстрирован повышенный уровень sMICA в сыворотке крови больных неходжкинскими лимфомами, тогда как у больных лимфомой Ходжкина (выборка из 26 человек) концентрация sMICA не отличалась от контрольных значений, зарегистрированных у практически здоровых людей [2]. В то же время не было проведено сравнительного анализа содержания sMICA у больных разными типами В-клеточных неходжкинских лимфом и у больных Т-клеточной лимфомой.

Целью исследования явилось изучение содержания белка sMICA в крови больных злокачественными лимфомами и его роли в ингибировании иммунного ответа. В экспериментальной модели показан феномен сбрасывания MICA с поверхности культивируемых опухолевых клеток во внеклеточное пространство и снижение

активации эффекторных клеток через рецептор NKG2D, зависящее от содержания sMICA в культуральной среде. Проведено сравнение концентраций sMICA в сыворотке крови больных с различными типами В-клеточных и с Т-клеточной неходжкинскими лимфомами, и выявлены группы пациентов с повышенным, по сравнению с контрольной группой, содержанием циркулирующего sMICA. Получены предварительные результаты по оценке действия (иммуно)полихимо- и лучевой терапии на уровень sMICA.

Материалы и методы

Клеточные линии

Клеточная линия В-клеточного лейкоза человека C1R и ее клон C1R-MICA, трансфицированный плазмидой, содержащей ген *mica*, были любезно предоставлены доктором V.Groh-Spies (университет Вашингтона, Сиэтл, США). Различия в экспрессии белка MICA позволяют использовать данные клеточные линии для изучения феномена «сбрасывания» молекул MICA с поверхности опухолевых клеток с образованием растворимой формы этого белка – sMICA [28]. Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 (ПанЭко, РФ), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (HyClone, США), 50 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамина (далее полная среда) во флаконах при 37 °С в условиях повышенной влажности с 5% CO₂. При культивировании линии C1R-MICA дополнительно применяли антибиотик G418 в концентрации 1,5 мг/мл. Спонтанную экспрессию MICA на поверхности клеток C1R и C1R-MICA определяли с помощью проточной цитометрии после непрямого иммунофлуоресцентного окрашивания клеток с использованием моноклональных антител к MICA (R&D systems, США). Концентрацию белка sMICA в супернатантах клеток C1R и C1R-MICA, посаженных в плотности 400 тыс. клеток/мл, измеряли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) через каждые 24 ч инкубации в течение 4 суток.

Изучение влияния растворимой формы белка sMICA на активацию эффекторных клеток

При проведении анализа влияния sMICA на поверхностную экспрессию рецептора NKG2D в мононуклеарных клетках крови здоровых людей в качестве источника sMICA использовали супернатант 4-дневной культуры C1R-MICA. Контролем служил супернатант нетрансфицированных клеток линии C1R.

Выделение периферических мононуклеаров (ПМН) из крови человека проводили по стандартной методике на градиенте плотности фикола, как описано ранее [4]. Выделенные ПМН инкубировали в полной среде в присутствии 500

ед./мл IL-2 и 4-дневной культуральной среды линий C1R либо C1R-MICA в течение 24 ч. Супернатанты добавляли к ресуспендированным в полной среде ПМН в соотношении 1:1. Анализ экспрессии рецептора NKG2D на поверхности ПМН проводили после окрашивания флуоресцентно меченными антителами к NKG2D (CD314, eBioscience, США) методом проточной цитофлуориметрии.

Исследование концентрации sMICA в сыворотке крови: группы больных, сбор образцов

В исследование включено 79 образцов сыворотки крови первичных пациентов в возрасте старше 18 лет с гистологически верифицированным диагнозом злокачественных лимфом без признаков системной инфекции или тяжелых заболеваний сердечно-сосудистой, нервной, дыхательной или эндокринной систем. У больных не было в анамнезе других онкологических заболеваний. В исследование не включались пациенты, у которых может быть повышен уровень sMICA, в частности с положительным тестом на ВИЧ [24], а также беременные или кормящие грудью женщины. Контрольную группу составили образцы сыворотки крови практически здоровых людей. Для получения сывороток пробирки с периферической кровью центрифугировали при 200 g в течение 10 мин, надосадок (0,5-1 мл) отбирали в микропробирку. Образцы сывороток замораживали и хранили при -30 °С. У всех участников исследования была проведена оценка содержания sMICA в сыворотке крови.

Анализ динамики уровня sMICA провели у шести больных зрелыми В-клеточными лимфомами в ходе лечения в Медицинском радиологическом научном центре им. А.Ф. Цыба (г. Обнинск) с применением (иммуно)химиотерапии по разным протоколам, лучевой терапии (ЛТ) или высокодозной химиотерапии (ВДХТ). Образцы сыворотки крови этих больных отбирали до и после этапа проведенного лечения.

Метод определения sMICA

Содержание белка sMICA определяли с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческого набора антител (R&D Systems, США). В лунки 96-луночного планшета повышенной сорбционной емкости наносили мышинные антитела к человеческому белку sMICA в концентрации 2 мкг/мл в фосфатном буферном солевом растворе, pH 7,2 (PBS), инкубировали в течение ночи, затем трижды промывали лунки буфером для отмывки (0,05% Tween 20 в PBS). Далее вносили в лунки блокирующий буфер на основе PBS, содержащий 1% бычьего сывороточного альбумина (BSA), и через 1 ч отмывали. В подготовленные лунки вносили предварительно разведенные в 2-4 раза сыво-

ротки крови больных или здоровых людей, супернатанты клеточных культур или стандартные образцы рекомбинантного человеческого белка sMICA, инкубировали в течение 2 ч с последующей отмывкой. В каждую лунку добавляли биотинилированные козы антитела к другому эпитопу sMICA (400 нг/мл, 1% BSA в PBS), инкубировали в течение 2 ч и промывали лунки. Затем в лунки вносили раствор конъюгата стрептавидина с пероксидазой хрена, инкубировали 20 мин в темноте и отмывали. Ферментативную реакцию проявляли с помощью 3,3',5,5'-тетраметилбензидина в присутствии перекиси водорода и через 20 мин останавливали путем добавления в каждую лунку 2N раствора серной кислоты. Измерение оптической плотности образцов проводили при длине волны 450 нм с помощью планшетного ридера Multiskan FC (Thermo Scientific, США). Концентрацию sMICA определяли с помощью калибровочной кривой. Статистический анализ данных, полученных в разных группах, проводили с помощью метода Манна–Уитни с использованием компьютерной программы SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США).

Проточная цитофлуориметрия

Уровень флуоресценции клеток оценивали на проточном цитофлуориметре FACScan (Becton Dickinson, США). В каждом образце при анализе поверхностной экспрессии антигенов измеряли не менее 10000 событий, зарегистрированных в секторе живых клеток. Кроме того, в ПМН больных методом проточной цитофлуориметрии определяли соотношение основных популяций лимфоцитов, в том числе долю клеток, экспрессирующих CD20.

Полученные данные обрабатывали с помощью программ CellQuest (BD Biosciences, США) и WinMDI (Dr. Joe Trotter, США), с использованием t-критерия Стьюдента и U-критерия Манна–Уитни.

Результаты

1. Изучение феномена сбрасывания MICA с поверхности культивируемых опухолевых клеток

В нашем исследовании была использована модель *in vitro* для изучения механизмов влияния формы белка MICA на экспрессию активирующего рецептора NKG2D. В основу модели легло применение трансфицированной геном *mica* линии C1R-MICA. Уровень экспрессии белка MICA на поверхности этих клеток оказался значительно выше, чем в исходных опухолевых клетках C1R, на мембране которых белок MICA обнаруживался в небольшом количестве (рис. 1А). Полученные результаты позволили использовать трансфицированную клеточную линию C1R-MICA для изучения феномена «сбрасывания» молекул MICA с поверхности опухолевых клеток с образованием растворимой формы этого белка sMICA. С помощью иммуноферментного анализа было выявлено, что при культивировании этих клеток в среде в значительном количестве накапливается sMICA, концентрация sMICA в супернатанте культуры с 1 по 4 сутки инкубации постоянно увеличивалась и через 4 дня достигала концентраций 200–300 пг/мл (рис. 1Б).

2. Ингибирование экспрессии рецептора NKG2D в эффекторных клетках, зависимое от содержания sMICA в культуральной среде

Нами проведен анализ влияния sMICA на поверхностную экспрессию рецептора NKG2D

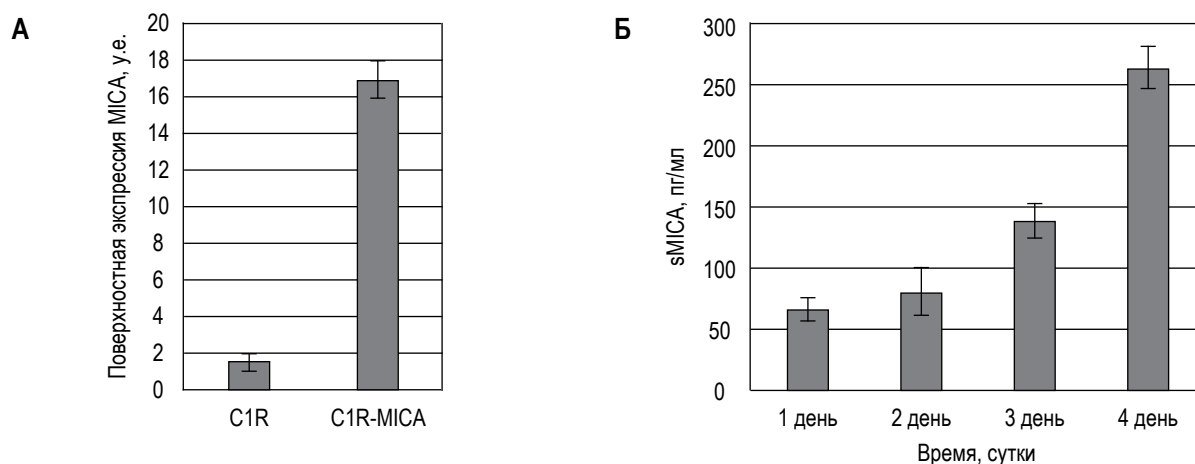


Рисунок 1. Экспрессия белка MICA в клеточных линиях C1R и C1R-MICA

Примечание. (А) Поверхностная экспрессия белка MICA на клетках C1R и C1R-MICA. (Б) Концентрация белка sMICA, накопленного в супернатанте трансфицированных опухолевых клеток C1R-MICA. На каждом из графиков представлены репрезентативные данные (среднее $\pm$ стандартное отклонение) одного из трех независимых экспериментов, выполненных в дублях.

в мононуклеарных клетках крови здоровых людей. В качестве источника sMICA использован супернатант 4-дневной культуры C1R-MICA, содержащий 280 пг/мл, тогда как контролем служил супернатант аналогичной культуры нетрансфицированных клеток линии C1R, содержащий, согласно проведенному ИФА, 24 пг/мл sMICA. В исследованиях других авторов было показано, что протеолитический шеддинг белка MICA с поверхности опухолевых клеток с образованием sMICA может приводить к анергии эффекторных клеток за счет уменьшения поверхностной экспрессии рецептора NKG2D, что определяет механизм уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора [15, 28]. В данном эксперименте было установлено, что инкубация NK-клеток в присутствии IL-2 с супернатантом опухолевых клеток C1R-MICA, содержащим растворимые формы молекул MICA, уже через сутки вызывает снижение экспрессии активационного рецептора NKG2D (рис. 2).

3. Концентрация sMICA в сыворотках крови больных при разных формах злокачественных лимфом

Повышенный уровень sMICA в сыворотке крови больных с различными злокачественными новообразованиями был нами ранее выявлен в нескольких группах пациентов с солидными опухолями, в том числе при раке гортаноглотки, толстого кишечника и желудка, молочной железы и шейки матки [1, 2]. Также нами был проведен анализ sMICA у ряда онкогематологических больных [2]. Увеличенный уровень sMICA был

выявлен в большой группе больных неходжкинскими лимфомами, в то время как у пациентов с болезнью Ходжкина концентрация sMICA в сыворотке крови достоверно не отличалась от таковой в группе здоровых людей. В настоящем исследовании была поставлена задача выяснить различия уровня циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови больных разными типами злокачественных лимфом. Пациенты, обследованные в данной работе, были разделены на группы по типу лимфопролиферативного заболевания. У большей части пациентов были выявлены зрелые В-клеточные лимфомы: хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) у 20 пациентов, фолликулярная лимфома (ФЛ) у 11 пациентов, диффузная В-крупноклеточная лимфома (ДБККЛ) у 24 пациентов, множественная миелома (ММ) у 18 пациентов и беркиттоподобная лимфома (БЛ) у 2 пациентов. Дополнительную группу составили 4 пациента с Т-клеточной анапластической лимфомой (ТАЛ) — агрессивно протекающим заболеванием. В контрольную группу вошли 59 практически здоровых людей.

Основные полученные данные по содержанию циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови больных лимфопролиферативными заболеваниями представлены в таблице 1 и на рисунке 3. Минимальное количество сывороточного sMICA было зарегистрировано в контрольной группе с медианой 20 пг/мл. Расчет средних значений и стандартного отклонения выявил, что показатели не соответствуют нормальному распределению, и для сопоставления групповых средних значений не может быть применен t-критерий Стьюдента. Сравнительный статистический анализ был проведен по критерию Манна–Уитни (U). Содержание sMICA в сыворотке крови больных В-клеточными лимфомами (объединенная группа: ХЛЛ, ФЛ, ДБККЛ, ММ и БЛ) было увеличено более чем в 6,5 раз по сравнению с контрольной группой (табл. 1). Уровень sMICA у пациентов с Т-клеточными лимфомами не только достоверно отличался от контрольной группы, но и, несмотря на небольшое количество образцов в группе, оказался статистически значимо выше, чем у больных В-клеточными лимфомами ($P = 0,041$).

При сравнительном анализе сывороточного содержания sMICA у больных разными типами неходжкинских лимфом было выявлено, что уровень sMICA во всех исследованных группах был значительно выше, чем у здоровых людей, за исключением группы пациентов с фолликулярной лимфомой, в которой отличия оказались недостоверными ($P = 0,103$) (рис. 3). Концентрация sMICA в этих группах больных превышала контрольный уровень в 7–14 раз, в то же время

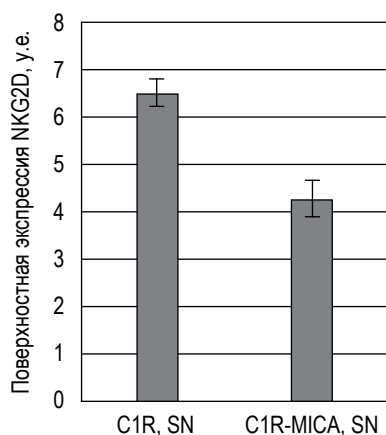


Рисунок 2. Экспрессия рецептора NKG2D на поверхности мононуклеаров крови человека через 24 ч их инкубации с супернатантами (SN) от клеточных линий C1R и C1R-MICA при содержании в культуре 12 пг/мл и 140 пг/мл sMICA соответственно

Примечание. Представлены репрезентативные данные (среднее $\pm$ стандартное отклонение) одного из трех независимых экспериментов, выполненных в дублях.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ БЕЛКА sMICA В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ, БОЛЬНЫХ ЗРЕЛЫМИ В-КЛЕТОЧНЫМИ И Т-КЛЕТОЧНЫМИ ЛИМФОМАМИ

Группы (n – число пациентов)	Среднее $\pm$ станд. откл., пг/мл	Медиана, пг/мл	Критерий U	Уровень значимости
Здоровые люди (n = 59)	37,3 $\pm$ 49,8	20		
В-клеточные лимфомы (n = 75)	249,4 $\pm$ 238,6	228	975,5	P = < 0,001
Т-клеточные лимфомы (n = 4)	526,0 $\pm$ 265,4	574	2	P = < 0,001

Примечание. U – критерий Манна–Уитни, P – уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой.

наблюдался значительный разброс концентрации sMICA между пациентами. Минимальное увеличение sMICA среди больных зрелыми В-клеточными лимфомами (медиана 64 пг/мл) было зарегистрировано в группе пациентов с ФЛ. Максимальное значение медианы значений sMICA было зарегистрировано в группе ДБККЛ (медиана 278 пг/мл), в то же время по среднему уровню значений sMICA группы ДБККЛ, ХЛЛ и ММ практически не различались (270,7; 271,8 и 272,4 пг/мл соответственно). При рассмотрении несекретирующей и Ig-секретирующей форм ММ в отдельных подгруппах были получены разные значения медиан sMICA (64 и 340 пг/мл соответственно), в то же время различия между подгруппами оказались недостоверными (P = 0,138). У пациентов группы с Т-клеточной анапластической лимфомой концентрация рас-

творимого белка sMICA многократно превышала контрольные значения, демонстрируя максимальное увеличение уровня sMICA среди исследованных групп больных (табл. 1, рис. 3). Однако необходимо еще раз отметить, что число пациентов в этой группе было небольшим, и для подтверждения полученных данных необходимы дальнейшие исследования.

4. Изменение сывороточной концентрации sMICA в период лечения

Оценка динамики sMICA на этапах проводимой противоопухолевой терапии и ее сопоставление с достигнутыми результатами лечения могут дать дополнительную информацию для понимания механизмов восстановления иммунного контроля опухолей. Для того чтобы оценить, как изменяется уровень циркулирующего sMICA у больных на фоне проводимого

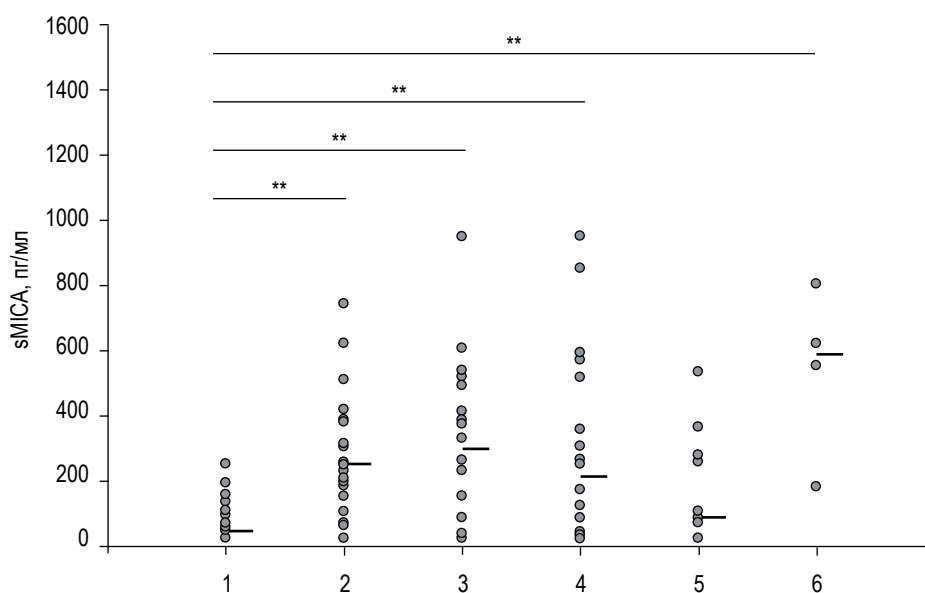


Рисунок 3. Содержание sMICA в сыворотке крови пациентов

Примечание. 1 – здоровые люди (контроль), 2 – ХЛЛ, 3 – ДБККЛ, 4 – ММ, 5 – ФЛ, 6 – ТАЛ. Горизонтальными черточками отмечены значения медианы, ** – уровень значимости различий по сравнению с контрольной группой людей (P ≤ 0,001).

лечения, мы сопоставили исходную концентрацию sMICA в сыворотке крови шести больных зрелыми В-крупноклеточными лимфомами с ее уровнем после получения ими от 1 до 6 циклов химиотерапии (рис. 4) по протоколам FC (флударабин, циклофосфан), COP (циклофосфан, винкристин, преднизолон) либо иммунохимиотерапии с включением Ритуксимаба – R-FC, R-COP и R-CHOP (циклофосфан, доксорубин, винкристин, преднизолон). Один пациент получил 3 блока ВДХТ.

После проведенного лечения наблюдалась следующая динамика уровня sMICA: у четырех больных повышенная концентрация sMICA снизилась в 2,4-4,0 раза, у одного больного сохранился низкий исходный уровень этого белка и у одного – его концентрация повысилась. Пациентом, лечение которого приводило к росту концентрации sMICA в сыворотке крови, оказался больной БЛ. У данного пациента на фоне проведения трех блоков ВДХТ концентрация sMICA в сыворотке крови увеличилась в 5 раз. У четырех больных лечение включало применение Ритуксимаба, что привело к снижению доли CD20-позитивных клеток в периферической крови (в 2-820 раз, в зависимости от исходного уровня). У трех больных исходный уровень sMICA был повышенным и снизился после лечения. У одного больного с диагнозом ФЛ после проведения 4 циклов ПХТ по схеме R-COP концентрация sMICA в сыворотке крови практически не изменилась и осталась низкой (концентрация sMICA в сыворотке крови до лечения составляла 48 пг/мл, а после лечения – 68 пг/мл) (рис. 4, больной 4).

Динамика сывороточного уровня белка sMICA на протяжении более длительного времени (бо-

лее 3 лет) была прослежена у больного ХЛЛ, который за период наблюдения получил последовательно несколько циклов иммунохимиотерапии по следующим протоколам: R-FC с включением Ритуксимаба (в течение 1,5 лет), FMC с включением Кэмпаса (в течение 1 года), только Кэмпас (в течение 0,5 года) и CO (циклофосфан, винкристин) (в течение последнего месяца жизни). Результаты анализа содержания sMICA в сыворотке крови этого больного в разные периоды течения болезни и соответствующей терапии представлены на рисунке 5.

При первичном обращении у больного был зарегистрирован высокий уровень sMICA в сыворотке крови (732 пг/мл). Первый период лечения по протоколу R-FC с включением Ритуксимаба сопровождался снижением уровня sMICA при наблюдении через 1,5 года. За это время доля клеток, экспрессирующих CD20, составлявшая в ПМН до лечения 35%, снизилась до 0,3% (в 117 раз). Далее, несмотря на проводимую терапию с включением Кэмпаса, содержание sMICA в циркуляции неуклонно повышалось и через 3 года после первичного обращения достигало значений, сравнимых с начальным уровнем (616 пг/мл). Дальнейшая терапия по протоколу CO сопровождалась резким снижением уровня sMICA в сыворотке крови больного. Однако в данном случае оно не коррелировало с ремиссией заболевания.

Обсуждение

Таким образом, полученные нами результаты свидетельствуют о повышенном содержании sMICA в сыворотке крови при злокачественных лимфомах. Наличие у больных лимфомами разных аллелей белка MICA, которые могут значительно различаться по уровню поверхностной



Рисунок 4. Изменение показателей уровня sMICA в сыворотке крови больных зрелыми В-клеточными лимфомами на этапах лечения по схемам

Примечание. 4 цикла ПХТ, R-FC (больной 1); 6 циклов R-CHOP, ЛТ (больной 2); 6 циклов COP, ЛТ (больной 3); 4 цикла ПХТ, R-COP (больной 4); 1 цикл ПХТ FC, 3 цикла R-FC (больной 5); ВДХТ, 3 блока (больной 6).

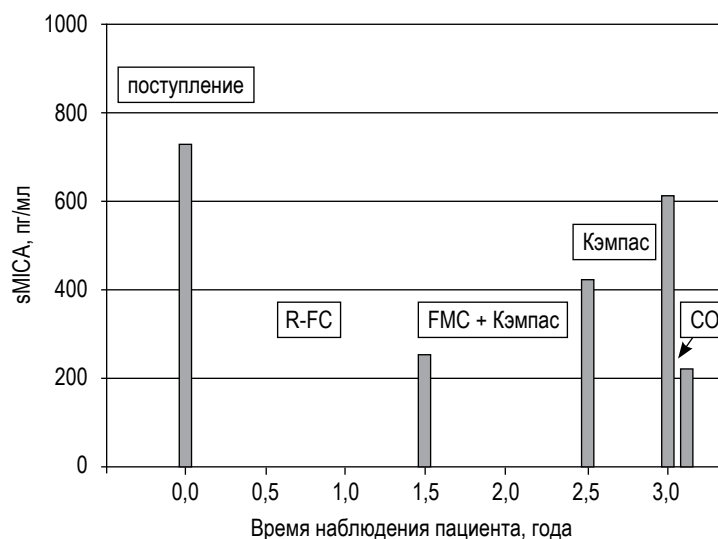


Рисунок 5. Динамика содержания sMICA в сыворотке крови больного ХЛЛ в ответ на разные схемы лечения в разные периоды течения болезни

экспрессии и образованию сывороточных форм [11], по-видимому, можно привлечь к объяснению значительного разброса в концентрациях sMICA, наблюдаемого в исследовании.

С другой стороны, в системе *ex vivo* продемонстрировано sMICA-зависимое угнетение экспрессии активирующего рецептора NKG2D на NK-клетках здоровых людей. Известно, что NK-клетки могут играть значительную роль в иммунном ответе против опухолей гематологического происхождения, возможно, за счет большей доступности этих эффекторов, по сравнению с солидными опухолями, к потенциальным клеткам-мишеням. Логично предположить, что механизмы экспрессии MICA на поверхности измененных клеток и «сбрасывание» этих молекул в кровь с образованием растворимой формы sMICA могут играть значительную роль в патогенезе гематологических злокачественных заболеваний.

Среди исследованных групп больных только в группе больных с фолликулярной лимфомой нами не было выявлено статистически значимого отличия значений уровня sMICA от контроля, хотя, возможно, при наличии большего количества образцов в группе искомый уровень достоверности мог бы быть достигнут. В группах ДБККЛ, ХЛЛ и ММ средний уровень сывороточных концентраций sMICA оказался весьма сходным.

Наблюдаемое снижение сывороточной концентрации sMICA у большей части пациентов в период лечения, наряду с уменьшением количества CD20⁺В-лимфоцитов после применения Ритуксимаба, может свидетельствовать об эф-

фективности проводимой терапии. Выявленное увеличение белка sMICA в сыворотке крови у больного с беркиттоподобной лимфомой в период лечения, по-видимому, связано с прогрессией заболевания, обусловленной резистентностью данной беркиттоподобной лимфомы к применяемым препаратам. С другой стороны, с учетом того, что в данном исследовании только у этого больного в курс лечения была включена высокодозная химиотерапия, представляется возможным, что такой вид терапии способствовал росту экспрессии белка MICA, индуцированной клеточным стрессом, и усилению шеддинга sMICA с поверхности опухолевых клеток. Отсутствие значимого количества циркулирующего sMICA в сыворотке крови у одного из больных фолликулярной лимфомой может быть связано с наличием у него одного из аллелей MICA, для которых нехарактерна высокая поверхностная экспрессия этого маркера либо нарушен механизм высвобождения sMICA из клетки. При длительном наблюдении динамики сывороточного уровня sMICA обнаруженное увеличение сывороточной концентрации этого белка у больного ХЛЛ на этапе лечения по протоколу FMC с включением Кэмпаса и только одним Кэмпасом после значительного его снижения при лечении по протоколу R-FC может быть связано с увеличением поверхностной экспрессии белка MICA в опухолевых клетках, вызванной прогрессией заболевания.

Очевидно, положительная или отрицательная роль белка MICA определяется балансом его активирующего действия на эффекторное звено лимфоцитов, экспрессирующих рецептор

NKG2D, и ингибирующего влияния его растворимых форм на NK-клетки и другие типы цитотоксических лимфоцитов. Повышенный сывороточный уровень sMICA можно оценивать как один из факторов развития онкогематологического заболевания. В то же время при его низком содержании прогрессия заболевания может быть обусловлена участием других факторов.

Таким образом, в экспериментальной модели нами показано, что повышение уровня sMICA в культуральной среде приводит к снижению уровня экспрессии одного из основных активирующих рецепторов цитотоксических лимфоцитов, NKG2D, что предполагает участие сывороточных молекул sMICA в супрессии противоопухолевого иммунного ответа.

Выполнен анализ содержания циркулирующего белка sMICA в сыворотке крови в группах больных различными типами злокачественных лимфом. Проведено сравнение полученных значений в группах больных и практически здоровых

людей. Выявлены группы пациентов, где чаще повышено содержание sMICA (ХЛЛ, ДБКЛ, ММ, ТАЛ).

Получены предварительные данные, свидетельствующие о супрессирующем влиянии разных компонентов (иммуно)химиотерапии, в частности ритуксимаба, и лучевой терапии лимфом на уровень сывороточного sMICA. Повышенный уровень этого показателя может служить дополнительным критерием развития онкогематологического заболевания. Мониторинг уровня sMICA, наблюдающегося после лечебных воздействий, создает предпосылку использования этого показателя в комплексе методов оценки эффективности проводимой терапии. Контроль уровня циркулирующего белка sMICA у онкогематологических больных может быть также использован в качестве теста, определяющего правильность подбора и эффективность применения методов специфической иммунотерапии.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Неприна Г.С., Пасова И.А., Бердов Б.А., Клинкова А.В., Коваленко Е.И., Каприн А.Д. Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул MICA в сыворотке крови больных раком желудка и толстой кишки // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 63-67. [Abakushina E.V., Abakushin D.N., Neprina G.S., Pasova I.A., Berdov B.A., Klinkova A.V., Kovalenko E.I., Kaprin A.D. Elevation of serum levels of cytokines and stress-induced molecules MICA in patients with gaster and colon cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 63-67. (In Russ.)]
2. Абакушина Е.В., Клинкова А.В., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул MICA при онкологических заболеваниях // Молекулярная медицина, 2014. № 3. С. 34-38. [Abakushina E. V., Klinkova A.V., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. Elevated levels of soluble forms of stress-induced molecule MICA in sera of patients with oncological diseases. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2014, no. 3, pp. 34-38. (In Russ.)]
3. Данилова А.Б., Данилов А.О., Фахрутдинова О.Л., Балдуева И.А., Моисеенко В.М. Иммунохимический анализ продукции MICA опухолевыми клетками *in vitro* и *in vivo* в контексте создания и применения противоопухолевых вакцин // Вопросы онкологии, 2010. Т. 56, № 5. С. 576-582 [Danilova A.B., Danilov A.O., Fakhrumdinova O.L., Badueva I.A., Moiseenko V.M. Immunochemical assay of MICA production by tumor cells *in vitro* and *in vivo* as a component of antitumor vaccine development. *Voprosy onkologii = Vopr. Onkol.*, 2010, Vol. 56, no 5, pp. 576-582. (In Russ.)]
4. Коваленко Е.И., Хирова Е.В., Молотковская И.М., Овчинникова Т.В., Саблина М.А., Сапожников А.М., Хайдуков С.В., Бовин Н.В. Модификация поверхности клеток с помощью липофильных гликоконъюгатов и взаимодействие модифицированных клеток с натуральными киллерами // Биоорганическая химия, 2004. Т. 30, № 3. С. 281-292. [Kovalenko E.I., Khirova E.V., Molotkovskaya I.M., Ovchinnikova T.V., Sablina M.A., Sapozhnikov A.M., Khaidukov S.V., Bovin N.V. The modification of cell surface with lipophilic glycoconjugates and the interaction of modified cells with natural killer cells. *Bioorganicheskaya khimiya = Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2004, Vol. 30, no. 3, pp. 281-292. (In Russ.)]
5. Arreygue-Garcia N.A., Daneri-Navarro A., del Toro-Arreola A., Cid-Arregui A., Gonzalez-Ramella O., Jave-Suarez L.F., Aguilar-Lemarroy A., Troyo-Sanroman R., Bravo-Cuellar A., Delgado-Rizo V., Garcia-Iglesias T., Hernandez-Flores G., del Toro-Arreola S. Augmented serum level of major histocompatibility complex class I-related chain A (MICA) protein and reduced NKG2D expression on NK and T cells in patients with cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer*, 2008, Vol. 8, p. 16.
6. Bahram S., Spies T. The MIC gene family. *Res. Immunol.*, 1996, Vol. 147, no. 5, pp. 328-333.
7. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999, Vol. 285, no. 5428, pp. 727-729.

8. Cosman D., Müllberg J., Sutherland C.L., Chin W., Armitage R., Fanslow W., Kubin M., Chalupny N.J. ULBPs, novel MHC class I-related molecules, bind to CMV glycoprotein UL16 and stimulate NK cytotoxicity through the NKG2D receptor. *Immunity*, 2001, Vol. 14, no. 2, pp. 123-133.
9. Dulphy N., Berrou J., Campillo J.A., Bagot M., Bensussan A., Toubert A. NKG2D ligands expression and NKG2D-mediated NK activity in Sezary patients. *J. Invest. Dermatol.*, 2009, Vol. 129, no. 2, pp. 359-364.
10. Fang X.C., Liu H.L., Sun Z.M., Gui L., Geng L.Q., Wang X.B., Zhou M., Wang Z.Y. Expression and abscission of activated receptors and their ligands on/from NK cells in peripheral blood of patients with acute leukemia. *Zhongguo Shi. Yan. Xue. Ye. Xue. Za. Zhi.*, 2010, Vol. 18, no. 2, pp. 436-440.
11. Gonzalez S., Groh V., Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, Vol. 298, pp. 121-138.
12. Groh V., Bahram S., Bauer S., Herman A., Beauchamp M., Spies T. Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.*, 1996, Vol. 93, pp. 12445-12450.
13. Groh V., Rhinehart R., Randolph-Habecker J., Topp M.S., Riddell S.R., Spies T. Costimulation of CD8 alphabeta T cells by NKG2D via engagement by MIC induced on virus-infected cells. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 3, pp. 255-260.
14. Bauer S., Grabstein K.H., Spies T. Broad tumor-associated expression and recognition by tumor-derived gamma delta T cells of MICA and MICB. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 1999, Vol. 96, no. 12, pp. 6879-6884.
15. Groh V., Wu J., Yee C., Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 2002, Vol. 419, no. 6908, pp. 734-738.
16. Holdenrieder S., Stieber P., Peterfi A., Nagel D., Steinle A., Salih H.R. Soluble MICA in malignant diseases. *Int. J. Cancer*, 2006, Vol. 118, no. 3, pp. 684-687.
17. Huergo-Zapico L., Gonzalez-Rodriguez A.P., Contesti J., Gonzalez E., López-Soto A., Fernandez-Guizan A., Acebes-Huerta A., de Los Toyos J.R., Lopez-Larrea C., Groh V., Spies T., Gonzalez S. Expression of ERp5 and GRP78 on the membrane of chronic lymphocytic leukemia cells: association with soluble MICA shedding. *Cancer. Immunol. Immunother.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1201-1210.
18. Jinushi M., Takehara T., Tatsumi T., Hiramatsu N., Sakamori R., Yamaguchi S., Hayashi N. Impairment of natural killer cell and dendritic cell functions by the soluble form of MHC class I-related chain A in advanced human hepatocellular carcinomas. *J. Hepatol.*, 2005, Vol. 43, no. 6, pp. 1013-1020.
19. Jinushi M., Vanneman M., Munshi N.C., Tai Y.T., Prabhala R.H., Ritz J., Neuberg D., Anderson K.C., Carrasco D.R., Dranoff G. MHC class I chain-related protein A antibodies and shedding are associated with the progression of multiple myeloma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2008, Vol. 105, no. 4, pp. 1285-1290.
20. Li P., Morris D.L., Willcox B.E., Steinle A., Spies T., Strong R.K. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand MICA. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 5, pp. 443-451.
21. Li P., Willie S.T., Bauer S., Morris D.L., Spies T., Strong R.K. Crystal structure of the MHC class I homolog MIC-A, a gammadelta T cell ligand. *Immunity*, 1999, Vol. 10, no. 5, pp. 577-584.
22. Ma L., Li G., Su Y., He Q., Zhang C., Zhang J. The soluble major histocompatibility complex class I-related chain A protein reduced NKG2D expression on natural killer and T cells from patients with prolactinoma and non-secreting pituitary adenoma. *J. Clin. Neurosci.*, 2010, Vol. 17, no. 2, pp. 241-247.
23. Märten A., Lilienfeld-Toal M., Büchler M.W., Schmidt J. Soluble MIC is elevated in the serum of patients with pancreatic carcinoma diminishing gammadelta T cell cytotoxicity. *Int. J. Cancer*, 2006, Vol. 119, no. 10, pp. 2359-2365.
24. Matusali G., Tchidjou H.K., Pontrelli G., Bernardi S., D'Ettorre G., Vullo V., Buonomini A.R., Andreoni M., Santoni A., Cerboni C., Doria M. Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. *FASEB J.*, 2013, Vol. 27, no. 6, pp. 2440-2450.
25. Nuckel H., Switala M., Sellmann L., Horn P.A., Durig J., Duhrsen U., Kuppers R., Grosse-Wilde H., Rebmann V. The prognostic significance of soluble NKG2D ligands in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*, 2010, Vol. 24, no. 6, pp. 1152-1159.
26. Raffaghello L., Prigione I., Airoidi I., Camoriano M., Levreri I., Gambini C., Pende D., Steinle A., Ferrone S., Pistoia V. Downregulation and/or release of NKG2D ligands as immune evasion strategy of human neuroblastoma. *Neoplasia*, 2004, Vol. 6, no. 5, pp. 558-568.
27. Salih H.R., Antropius H., Gieseke F., Lutz S.Z., Kanz L., Rammensee H.G., Steinle A. Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 4, pp. 1389-1396.
28. Salih H.R., Rammensee H.G., Steinle A. Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 8, pp. 4098-4102.
29. Swerdlow S.H., Campo E., Harris N.L., Jaffe E.S., Pileri S.A., Stein H., Thiele J., Vardiman J.W. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. The International Agency for Research on Cancer, Lyon, France: IARC Press, 2008.

30. Tamaki S., Sanefuzi N., Kawakami M., Aoki K., Imai Y., Yamanaka Y., Yamamoto K., Ishitani A., Hatake K., Kirita T. Association between soluble MICA levels and disease stage IV oral squamous cell carcinoma in Japanese patients. *Hum. Immunol.*, 2008, Vol. 69, no. 2, pp. 88-93.
31. Viny A.D., Clemente M.J., Jasek M., Askar M., Ishwaran H., Nowacki A., Zhang A., Maciejewski J.P. MICA polymorphism identified by whole genome array associated with NKG2D-mediated cytotoxicity in T-cell large granular lymphocyte leukemia. *Haematologica*, 2010, Vol. 95, no. 10, pp. 1713-1721.
32. Wu J., Song Y., Bakker A.B., Bauer S., Spies T., Lanier L.L., Phillips J.H. An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science*, 1999, Vol. 285, no. 5428, pp. 730-732.

Авторы:

Клинкова А.В. — младший научный сотрудник, лаборатория клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Кузьмина Е.Г. — к.б.н., заведующая лабораторией клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

Абакушина Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

Каневский Л.М. — к.б.н., научный сотрудник, лаборатория клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Неприна Г.С. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

Павлов В.В. — к.м.н., заведующий отделением лучевой и лекарственной терапии гемобластозов, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

Коваленко Е.И. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория клеточных взаимодействий ФГБУН «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Authors:

Klinkova A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Kuzmina E.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Kanevskiy L.M., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

Neprina G.S., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Pavlov V.V., PhD (Medicine), Head, Department of Radiation and Drug Therapy of Leukemia, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, affiliated to the National Medical Radiological Research Centre, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

Kovalenko E.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Moscow, Russian Federation

ИССЛЕДОВАНИЕ МИКРОФЛОРЫ И ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА СЛИЗИСТЫХ ОБОЛОЧЕК ВЕРХНИХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ПУТЕЙ ПРИ ВНУТРИУТРОБНОМ ИНФИЦИРОВАНИИ ПЛОДА И ПНЕВМОНИИ НОВОРОЖДЕННЫХ

Свитич О.А.¹, Омарова С.М.², Алиева А.И.², Рассказова Н.Д.¹,
Зверев В.В.¹

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

²Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Резюме. Инфекции, специфичные для перинатального периода в структуре причин младенческой смертности, составляют около 30%. Среди заболеваний органов дыхания в периоде новорожденности пневмония занимает особое место в связи с большой частотой, тяжестью течения, возможностью осложнений и неблагоприятных исходов. Целью данной работы являлось изучение микрофлоры и факторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, TNF α и NF- κ B) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных. Этиологическая структура ВАП у новорожденных, находящихся в отделении реанимации, представлена широким спектром возбудителей с высокой резистентностью к антибиотикам. Иммунологические показатели (распознающие структуры — TLR2, TLR4, дефензины HBD-1, HBD-2, провоспалительный цитокин TNF α и фактор транскрипции NF- κ B) у пациентов с внутриутробным инфицированием и с пневмонией изменяются неоднозначно. Выявлена тенденция к снижению экспрессии генов TLR2, TLR4 и увеличению экспрессии генов TNF α и NF- κ B. Данные изменения коррелируют с инфекционным возбудителем, следовательно, можно предположить, что непосредственно возбудитель за счет действия факторов патогенности влияет на показатели врожденного иммунитета.

Ключевые слова: новорожденные, вентилятор-ассоциированные и внутриутробные пневмонии, противомикробные пептиды, цитокины, врожденный иммунитет

Адрес для переписки:

Свитич Оксана Анатольевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин
и сывороток им. И.И. Мечникова»
123557, Москва, Россия, Зоологический пер., 8, 100.
Тел.: 8 (926) 148-83-22.
Факс: 8 (495) 674-57-10.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Address for correspondence:

Svitich Oksana A.
I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera
123557, Russian Federation, Moscow,
Zoologicheskoy Lane, 8, 100.
Phone: 7 (926) 148-83-22.
Fax: 7 (495) 674-57-10.
E-mail: svitichoa@yandex.ru

Образец цитирования:

О.А. Свитич, С.М. Омарова, А.И. Алиева, Н.Д. Рассказова,
В.В. Зверев, «Исследование микрофлоры и врожденного
иммунитета слизистых оболочек верхних дыхательных
путей при внутриутробном инфицировании плода
и пневмонии новорожденных» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 2. С. 163–170.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-163-170

©Свитич О.А. и соавт., 2016

For citation:

O.A. Svitich, S.M. Omarova, A.I. Alieva, N.D. Rasskazova,
V.V. Zverev, “Mucosal microflora and innate immunity of upper
respiratory tract in intrauterine foetal infection and pneumonia
of neonates”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 163–170.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-163-170

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-163-170>

MUCOSAL MICROFLORA AND INNATE IMMUNITY OF UPPER RESPIRATORY TRACT IN INTRAUTERINE FOETAL INFECTION AND PNEUMONIA OF NEONATES

Svitich O.A.^a, Omarova S.M.^b, Alieva A.I.^b, Rasskazova N.D.^a, Zverev V.V.^a

^a I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

^b Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Dagestan, Russian Federation

Abstract. Specific perinatal infections make about 30% in causal structure of infant mortality. Among the respiratory diseases of perinatal period, pneumonias take a special place, due to higher frequency, severity, complications and adverse outcomes. The aim of this work was to study microflora and factors of innate immunity (TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, TNF α and NF- κ B) at the level of the mucous membranes of the upper respiratory tract during intrauterine infection of fetus and perinatal pneumonia. Causal structure of ventilator-associated pneumonias at the intensive care unit represents a broad spectrum of pathogens with high resistance to antibiotics. Changes of immunological parameters (recognizing structures, i.e., TLR2, TLR4, HBD-1; HBD-2 defensins; proinflammatory TNF α cytokine and NF- κ B transcription factor) in patients with intrauterine infections and pneumonia are ambiguous. Decreased expression of TLR2, TLR4 genes, along with increased of TNF α and NF- κ B gene expression. These changes correlate with type of infectious pathogen, thus allowing us to assume that the pathogen, due to pathogenicity factors, may directly affect innate immunity mechanisms.

Keywords: newborns, ventilator-associated infections, intrauterine pneumonia, antimicrobial peptides, cytokines, innate immunity

Патология дыхательной системы является одной из основных причин высокой заболеваемости и смертности новорожденных детей [1]. В клинической практике подразделяют пневмонии новорожденных на внутриутробные (врожденные) и постнатальные (приобретенные), последние могут быть внебольничными и внутрибольничными. Почти 90% внутрибольничных пневмоний связано с искусственной вентиляцией легких (ИВЛ). В Российской Федерации заболеваемость пневмонией у новорожденных за последние 5 лет практически не меняется и не имеет тенденции к снижению, составляя в среднем 8,5‰ [6].

Наиболее частое осложнение искусственной вентиляции легких ИВЛ — вентилятор-ассоциированная пневмония (ВАП), возникающая примерно у 3-10% детей [7]. Возникает это осложнение у 7-30% новорожденных, находившихся в отделениях интенсивной терапии. Увеличение риска ВАП на 11% происходит с каждой дополнительной неделей ИВЛ [8, 12]. Внутриутробная пневмония (ВП) диагностируется у 10-15% де-

тей. Очень часто заболевание прослеживается у недоношенных и при гипотрофии плода [2, 4, 11]. В патогенезе пневмоний новорожденных значение имеют внутричерепные кровоизлияния, обуславливающие появление апноэ, цианоза, периодически возникающей асфиксии, а также нарушения гомеостаза при развитии недостаточности дыхания, гипоксемии, гиперкапнии, ацидоза и нарушения электролитного обмена. Наиболее часто пневмонии у новорожденных вызывают *Staphylococcus aureus*, в том числе метициллинорезистентные *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Proteus spp.*, *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter spp.*, *Enterobacter spp.* [13].

Предрасположенность новорожденных к возникновению инфекционных осложнений может быть обусловлена не только особенностями госпитальных штаммов микроорганизмов, но и состоянием иммунной системы новорожденных детей. Большое значение в распознавании патогенов имеют факторы врожденного иммунитета

(Toll-подобные рецепторы, цитокины, противомикробные пептиды) [3, 9, 10], которые распознают консервативные области вышеперечисленных микроорганизмов.

Для успешной борьбы с пневмониями новорожденных требуется знание не только клинико-микробиологических, но и иммунологических особенностей данной патологии. В связи с этим **целью данной работы** являлось изучение микрофлоры и факторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, TNF α и NF- κ B) на уровне слизистых оболочек верхних дыхательных путей при внутриутробном инфицировании плода и пневмонии новорожденных.

Материалы и методы

Исследования были проведены в ОРИТ родильного дома Республиканской клинической больницы г. Махачкала с 2012 по 2014 г. Критерии включения новорожденных в исследование: дети, у которых был выставлен диагноз «пневмония» (внутриутробная, вентилятор-ассоциированная). Критерии исключения: дети, у которых не подтвердился диагноз «пневмония». У всех новорожденных тяжесть состояния при рождении была обусловлена различной перинатальной патологией. У 54 новорожденных тяжесть состояния была обусловлена синдромом аспирации околоплодных вод, у 26 детей — гипоксическим поражением ЦНС и у 20 детей тяжесть состояния была обусловлена респираторным дистресс-синдромом.

При проведении бактериологического исследования клинического материала (кровь, трахеобронхиальный аспират) от новорожденных детей (173) с подозрением на пневмонию было изучено 936 клинических образца, выделено и идентифицировано до вида (рода) 587 штаммов микроорганизмов. Все выделенные и идентифицированные культуры протестированы на чувствительность к антибактериальным препаратам (МУК 4.2.1890-04), а также изучены некоторые биологические свойства для характеристики изолированных культур. Новорожденные родились у женщин с отягощенным соматическим и акушерско-гинекологическим анамнезом (анемия, гестоз, угроза прерывания). Всем детям проводились реанимационные мероприятия, в том числе ИВЛ.

Анализ данных анамнеза, клинической картины заболевания, результатов лабораторно-ин-

струментальных исследований позволил диагностировать внутриутробную пневмонию у 48 детей, постнатальную — у 23, аспирационную — у 15, вентилятор-ассоциированную — у 69, пневмонию на фоне врожденных пороков сердечно-сосудистой и дыхательной системы — у 18.

Методика исследования включала тщательный анализ анамнестических данных, выявление причин перинатального риска, оценку состояния ребенка в момент рождения, неврологический статус, характеристику респираторных расстройств, анализ результатов лабораторно-инструментальных исследований.

Для исследования экспрессии генов врожденного иммунитета TLR2, TLR4, HBD-1, HBD-2, TNF α и NF- κ B из клинического материала (эпителиальные клетки верхних дыхательных путей) проводили выделение РНК с использованием набора «РИБОсорб» (ИЛС, РФ). Далее проводили ОТ-реакцию с использованием набора «ОТ-1» (Синтол, РФ). Для приготовления ПЦР-смеси в реакциях использовали Hot Start Taq DNA Polymerase (Синтол, РФ) а также наборы «Набор реактивов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). ПЦР проводили в амплификаторе для ПЦР-РВ ДТ-96 (ДНК-технология, РФ). Системы для определения экспрессий исследуемых генов были отработаны ранее [2]. Определение уровня экспрессии генов проводилось относительно экспрессии гена β -актина. Статистическая обработка данных проводилась с использованием статистического пакета «STATISTICA 6.0». Для оценки достоверности различий по экспрессии исследуемого гена применяли непараметрический критерий Манна—Уитни. Различия между показателями в группах считались достоверными, если $p < 0,05$ [5].

Результаты и обсуждение

У большинства новорожденных были выделены грамотрицательные микроорганизмы (93%), среди которых преобладали энтеробактерии (79%). Энтеробактерии чаще всего были представлены *Klebsiella pneumonia* (33%), *Escherichia coli* (24%) и *Pseudomonas aeruginosa* (22%). Грампозитивные возбудители ВАП были представлены коагулазоотрицательными стафилококками, среди которых преобладали *Staphylococcus epidermidis*, обладающие гемолитическими свой-

ствами (26%). При затяжном течении ВАП основным возбудителем являлась *Stenotrophomonas maltophilia*.

Пневмония, обусловленная *K. pneumoniae*, у большинства имела острое течение. Проявления инфекционного токсикоза были менее выраженными, чем при ВАП другой этиологии. В периферической крови лейкоцитоз был у половины новорожденных и редко сопровождался сдвигом формулы влево и наличием токсической зернистости нейтрофилов, тромбоцитопения отмечалась только у 2 детей. При ВАП, вызванной *Ps. aeruginosa*, чаще, чем при других, отмечался геморрагический синдром, который клинически проявлялся в виде легочного кровотечения (у 10 из 35 детей). В 2,5 раза чаще, чем в целом по всей группе, отмечалось развитие пневмоторакса. Именно при этих пневмониях была самая высокая летальность (умерло 10 детей).

Пневмония, возбудителем которой являлась *E. coli*, протекала с выраженными проявлениями инфекционного токсикоза чаще, чем в других группах детей. Отмечались значительные воспалительные сдвиги в периферической крови у 5 детей в виде лейкоцитоза (в среднем $45,6 \pm 8,6 \times 10^9$ г/л), токсической зернистости нейтрофилов, анемия, повышение уровня С-реактивного белка. Именно при этих пневмониях осложнения в виде бронхолегочной дисплазии наблюдаются в 3 раза чаще, чем при ВАП другой этиологии. При данной этиологии пневмоний летальных исходов не было. При ВАП, вызванных *S. epidermidis*, более чем у двух третей детей наблюдались тяжелые формы и острое течение (у 12 из 15 детей). Летальность в этой группе составила 20% (умерло 3 детей).

Результаты исследования на внутриутробное инфицирование свидетельствуют о превалировании грамположительных возбудителей в клиническом материале от новорожденных с ВП над грамотрицательными бактериями и грибами рода *Candida*. Учитывая значительный удельный вес грамположительной микрофлоры среди выделенных возбудителей ВП, нами проведен анализ видового спектра патогенов в зависимости от нозологических форм патологии.

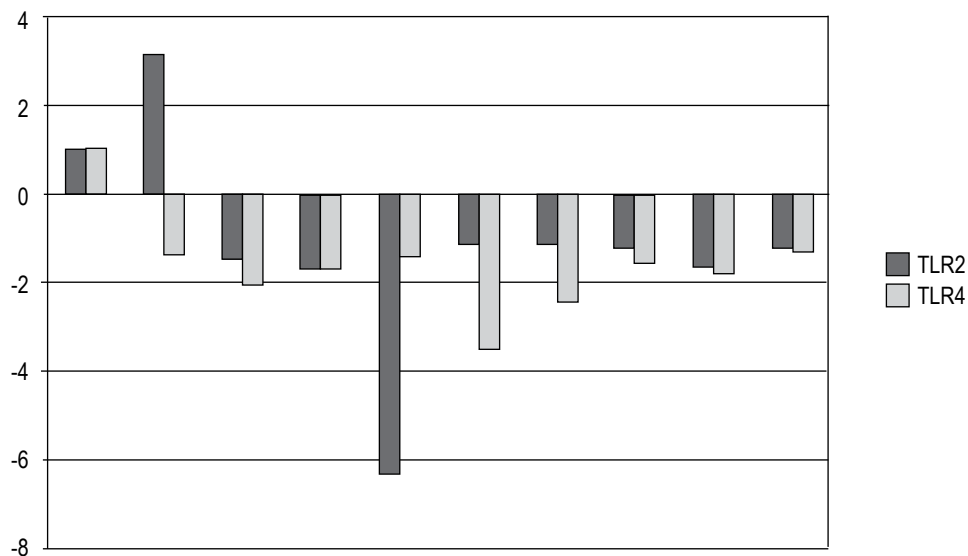
Как известно, степень патогенности зависит либо от силы действия одного либо от совокупности влияния нескольких факторов патогенности. Коагулазоотрицательные стафилококки составили 368 штамма (84,7,2%). Среди *S. aureus*

плазму коагулировали 58 культур, что составило 86,5%. Выделенные штаммы *S. aureus* продуцировали ферменты — лецитиназу, гемолизины и ДНК-азу в 87,5, 94,0 и 91,0% соответственно. В группе новорожденных детей продукция лецитиназы (87,5%) и гемолизина (94,0%) коагулазоположительными стафилококками значительно превышала ($p < 0,05$) аналогичные показатели у обследованных женщин, ДНК-азу выделяли — 91,0% культур. Коагулазоотрицательные стафилококки продуцировали данные факторы патогенности — *S. epidermidis* в 23,1 и 22,9% соответственно и не обладали ДНК-азой, а *S. saprophyticus* в 17,7 и 16,1% случаев соответственно. Как и в предыдущих группах, реакцию плазмокоагуляции вызывали не все относящиеся по классификации к КП видам стафилококки, а именно 86,5% штаммов. Было отмечено, что от детей третьего-пятого дня жизни, находившихся отдельно от матерей, стафилококки высевались достоверно реже ($p > 0,05$) — 73,9,2%, чем у обследованных женщин — 92,4%. Кроме того, они обладали наибольшим патогенным потенциалом. На втором месте по частоте обсемененности стафилококками, их видовому спектру и патогенности оказалась группа здоровых детей (25 новорожденных) в возрасте от 1 до 5 дней. Меньше всего были обсеменены стафилококками здоровые новорожденные 1-го дня жизни.

С целью определения тактики этиотропной антибактериальной терапии, а также для разработки эмпирической терапии с учетом региональных особенностей был проанализирован уровень резистентности к антибактериальным препаратам — 103 микроорганизма, выделенные из ТБА новорожденных с диагнозом «пневмония».

Изначально неадекватная терапия тяжелой инфекции, вне зависимости от ее локализации и типа возбудителя, увеличивает риск летального исхода. Это убеждает в целесообразности проведения адекватной эмпирической антибактериальной терапии, базирующейся на локальных данных о структуре и чувствительности циркулирующих в родильном стационаре возбудителей.

Выделенные штаммы *K. pneumoniae* проявляли резистентность к большинству антибиотиков и сохраняли 100% чувствительность к имипенему и меропенему. Высокую резистентность к анти-



Норма без инф./Норма+инф./ВУИ /Пневмония/Klebsiella spp/ E. coli / Кокки/Смеш. бак. инф./Смеш. вир. инф./Ps. aeruginosa

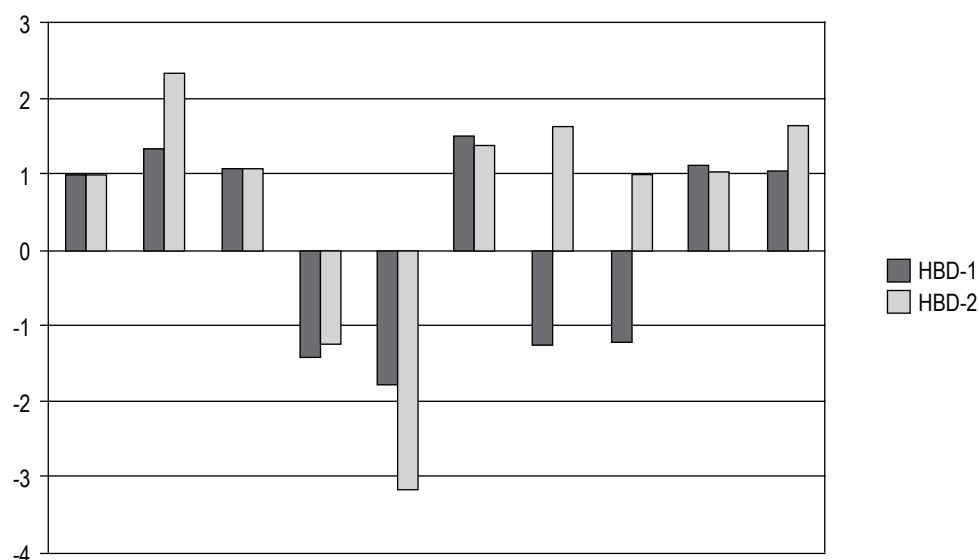
Рисунок 1. Экспрессия генов TLR2 и TLR4 в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей новорожденных с ВУИ и пневмонией

Примечание. По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – относительные единицы показателя экспрессии (показатель в опытной группе относительно показателя в группе сравнения).

биотикам также проявляли штаммы некоторых видов энтеробактерии. Так, среди выделенных штаммов *Ps. aeruginosa* большинство были устойчивыми к 11 из 14 исследуемых антибиотиков. Обращает на себя внимание высокий уровень резистентности к ампициллину (98%) и цефуроксиму (88%), цефазолину (81%), карбенициллину (43%), цефомандолу (82%) соответственно.

Большинство штаммов *S. epidermidis* проявляли резистентность к 14 из 20 исследуемых антибиотиков, сохраняя чувствительность к рифампицину, ванкомицину, линкомицину и амоксициллину.

Показатели врожденного иммунитета – Toll-подобные рецепторы (TLR2, TLR4) – экспрессировались на эпителиальных клетках верхних



Норма без инф./Норма+инф./ВУИ /Пневмония/Klebsiella spp/ E. coli / Кокки/Смеш. бак. инф./Смеш. вир. инф./Ps. aeruginosa

Рисунок 2. Экспрессия генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей новорожденных с ВУИ и пневмонией

Примечание. По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – относительные единицы показателя экспрессии (показатель в опытной группе относительно показателя в группе сравнения).

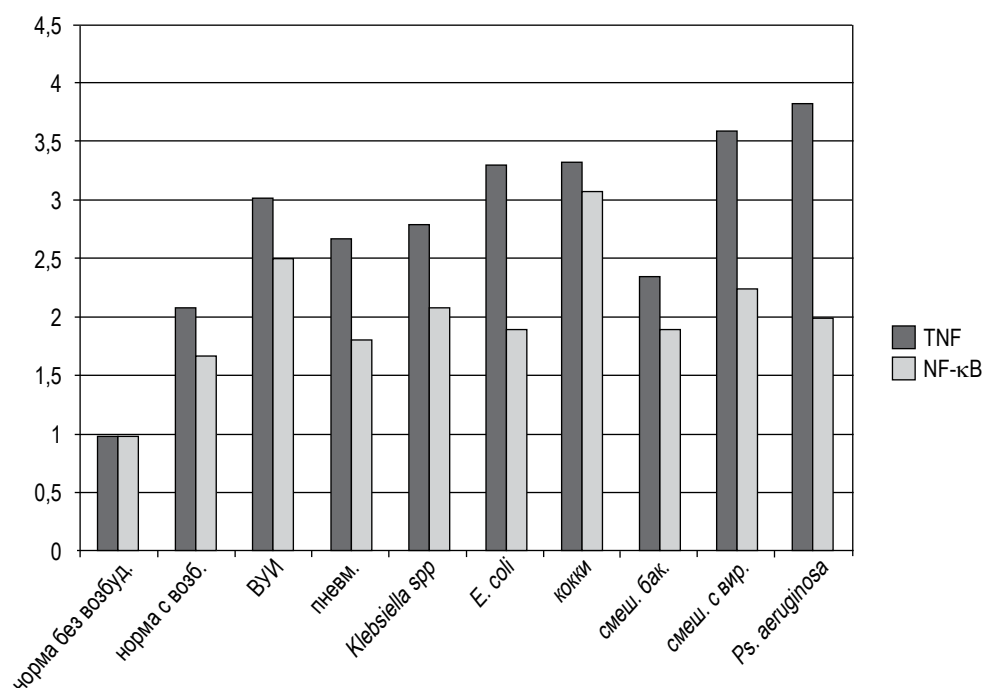


Рисунок 3. Экспрессия генов TNF и NF-κB в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей новорожденных с ВУИ и пневмонией

Примечание. По оси абсцисс – исследуемые группы. По оси ординат – относительные единицы показателя экспрессии (показатель в опытной группе относительно показателя в группе сравнения).

дыхательных путей как у новорожденных с ВП, так и у детей с ВАП.

Следует отметить, что у новорожденных с ВП уровни экспрессии распознающих структур были достоверно снижены в два раза, этот факт можно объяснить как генетическими особенностями организма ребенка, так и активностью факторов патогенности микроорганизмов. Для подтверждения последней гипотезы был проведен анализ ассоциации показателей врожденного иммунитета и наличием определенного возбудителя. Были выделены подгруппы детей с пневмониями, вызванными *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, кокковой флорой и смешанной инфекцией. Показано, что экспрессия гена TLR2 снижалась в 6,2 раза у пациентов с *Klebsiella pneumoniae* и в два раза и более при смешанной инфекции. Уровни экспрессии гена TLR4 были снижены более чем в три раза при инфекции, вызванной *Escherichia coli* (рис. 1).

На следующем этапе были определены уровни экспрессии генов HBD-1 и HBD-2 в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей у новорожденных с ВП, у детей с ВАП и у здоровых детей. Известно, что дефенсины осуществляют защиту слизистых от инфекционных воз-

будителей. HBD-1 постоянно вырабатывается на уровне слизистой верхних дыхательных путей, а HBD-2 – индуцибельно, т.е. под действием инфекционных патогенов. Показано, что экспрессия гена HBD-2 увеличивается в 2,3 раза у детей, у которых определяется инфекционный возбудитель, но при этом отсутствуют клинические проявления пневмонии. Также показано достоверное снижение показателя HBD-2 (в 3,2 раза) у пациентов с пневмонией, вызванной *Klebsiella pneumoniae*. Показатели HBD-1 во всех исследуемых группах менялись недостоверно (рис. 2).

Помимо дефенсинов, был проведен анализ экспрессии генов провоспалительного цитокина TNFα и фактора транскрипции NF-κB в эпителиальных клетках верхних дыхательных путей в исследуемых группах. Данные молекулы участвуют в сигнальном пути с TLRs. Так, было показано, что у детей, у которых выявляли инфекционные возбудители, но не было клинических проявлений, показатель цитокина возрастал более чем в два раза. Это можно объяснить тем, что инфекционные возбудители через TLR активируют выработку провоспалительного цитокина TNFα. В группах с внутриутробным инфицированием, с пневмонией новорожден-

ных, вызванной *E. coli*, *Ps. aeruginosa*, кокками и при смешанной инфекции показатель $TNF\alpha$ возрастал в 3-4 раза относительно показателя в группе сравнения (рис. 3). Уровень экспрессии гена NF- κ B достоверно увеличивался только в группах пациентов с внутриутробным инфицированием плода (в 2,5 раза) и у новорожденных с пневмонией, вызванной кокковой микрофлорой (в 3,1 раз).

Таким образом, этиологическая структура ВАП у новорожденных, находящихся в отделении реанимации, представлена широким спектром возбудителей с высокой резистентностью к антибиотикам. Широкий спектр микроорганизмов и тяжелое течение заболевания связаны

с иммунодефицитным состоянием у новорожденных с ВАП. Иммунологические показатели (распознающие структуры — TLR2, TLR4, дефензины HBD-1, HBD-2, провоспалительный цитокин $TNF\alpha$ и фактор транскрипции NF- κ B) у пациентов с внутриутробным инфицированием и с пневмонией изменяются неоднозначно. Выявлена тенденция к снижению экспрессии генов TLR2, TLR4 и увеличению экспрессии генов $TNF\alpha$ и NF- κ B. Данные изменения коррелируют с инфекционным возбудителем, следовательно, можно предположить, что непосредственно возбудитель за счет действия факторов патогенности влияет на показатели врожденного иммунитета.

Список литературы / References

1. Володин Н.Н. Актуальные проблемы неонатологии. М.: ГЭОТАР-медиа, 2004. 448 с. [Volodin N.N. Actual problems of neonatology.] Moscow: GEOTAR-media, 2004. 448 p.
2. Ганковская О.А., Бахарева И.В., Ганковская Л.В., Сомова О.Ю., Зверев В.В. Исследование экспрессии генов TLR9, NF- κ B, ФНО α в клетках слизистой цервикального канала беременных с герпесвирусной инфекцией // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2009. № 2. С.61-65. [Gankovskaya O.A., Bakhareva I.V., Gankovskaya L.V., Somova O.Yu., Zverev V.V. The Investigation of gene expression of TLR9, NF- κ B, $TNF\alpha$ cells in the cervical mucosa of pregnant women with herpes viral infection. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2009, no. 2, pp. 61-65. (In Russ.)]
3. Ганковская О.А., Ганковская Л.В., Сомова О.Ю., Зверев В.В. Toll-подобные рецепторы, распознающие лиганды вируса герпеса // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2009. № 2. С. 108-111. [Gankovskaya O.A., Gankovskaya L.V., Somova O.Yu., Zverev V.V. Toll-like receptors recognizing ligands of herpesvirus. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2009, no. 2, pp. 108-111. (In Russ.)]
4. Геппе Н.А., Волков И.К. Перспективы развития и проблемы детской пульмонологии в России // Пульмонология, 2007. № 4. С. 56. [Geppe, N.A., Volkov I.K. Prospects of development and problems of pediatric pulmonology in Russia. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2007, no. 4, p. 56. (In Russ.)]
5. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glants S. Medical-biological statistics]. Moscow: Practice, 1998. 459 p.
6. Черняховский О.Б., Абрамова И.В., Полянчикова О.Л. Внутриутробные инфекции у новорожденных, факторы риска // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 2009. № 1. С. 80-88. [Chernyakhovsky O.B., Abramova I.V., Palyanchikova O.L. Intrauterine infection in newborns, risk factors. *Rossiyskiy vestnik perinatologii i pediatrii = Russian Journal of Perinatology and Pediatrics*, 2009, no. 1, pp. 80-88. (In Russ.)]
7. Fang C.T., Lai S.Y., Yi W.C., Hsueh P.R., Liu K.L., Chang S.C. Klebsiella pneumoniae Genotype K1: An Emerging Pathogen That Causes Septic Ocular or Central Nervous System Complications from Pyogenic Liver Abscess. *Clinical Infectious Diseases*, 2007, Vol. 45, pp. 284-293.
8. Hemming V.G., Overall J.C.Jr., Britt M.R. Nosocomial infections in a newborn intensive-care unit: Results of forty-one months of surveillance. *N. Engl. J. Med.*, 1976, Vol. 294, pp. 1310-1316.
9. Morita H., Arae K., Ohno T., Kajiwara N., Oboki K., Matsuda A., Suto H., Okumura K., Sudo K., Takahashi T., Matsumoto K., Nakae S. ST2 Requires Th2-, but Not Th17-, Type Airway Inflammation in Epicutaneously Antigen-Sensitized Mice. *Allergy International*, 2012, Vol. 61, pp. 265-273.

10. Shinkai H., Tanaka M., Morozumi T., Eguchi-Ogawa T., Okumura N., Muneta Y., Awata T., Uenishi H. Biased distribution of single nucleotide polymorphisms (SNPs) in porcine Toll-like receptor 1 (TLR1), TLR2, TLR4, TLR5 and TLR6 genes. *Immunogenetics*, 2006, Vol. 58, pp. 324-330.
11. McGuire W., Clerihew L., Fowlie P.W. Infection in the preterm infant. *BMJ*, 2004, Vol. 2, pp. 329-341.
12. Nseir S., Ader F., Marquette C.H. Nosocomial tracheobronchitis. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2009, Vol. 22, no. 2, pp. 148-153.
13. Palmer L.B., Smaldone G.C., Chen J.J., Baram D., Duan T., Monteforte M., Varela M., Tempone A.K., O'Riordan T., Darowalla F., Richman P. Aerosolized antibiotics and ventilator-associated tracheobronchitis in the intensive care unit. *Crit. Care Med.*, 2008, Vol. 36, no. 7, pp. 2008-2013.

Авторы:

Свитич О.А. — д.м.н., заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Омарова С.М. — д.м.н., профессор кафедры микробиологии, Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Алиева А.И. — к.м.н., доцент кафедры микробиологии, Дагестанская государственная медицинская академия, г. Махачкала, Республика Дагестан, Россия

Рассказова Н.Д. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Зверев В.В. — д.б.н., профессор, академик РАН, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Chief, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Omarova S.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Dagestan, Russian Federation

Alieva A.I., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Microbiology, Dagestan State Medical Academy, Makhachkala, Dagestan, Russian Federation

Rasskazova N.D., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Zverev V.V., PhD, MD (Biology), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 17.04.2015
Отправлена на доработку 24.09.2015
Принята к печати 15.10.2015

Received 17.04.2015
Revision received 24.09.2015
Accepted 15.10.2015

ОЦЕНКА ОСНОВНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С ЧРЕСКОЖНОЙ ТРАНСЛЮМИНАЛЬНОЙ КОРОНАРНОЙ АНГИОПЛАСТИКОЙ СО СТЕНТИРОВАНИЕМ

Шкода О.С., Шилова А.Н., Козырева В.С., Чернявский А.М.

ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Обследован 31 пациент с ишемической болезнью сердца до процедуры чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластики со стентированием и через сутки после. Проводилось типирование основных субпопуляций лимфоцитов методом проточной цитометрии ($CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD19^+$, $CD3^+CD16^+CD56^+$, $CD3^+CD16^+CD56^-$). Обнаружено статистически значимое снижение относительного количества общих Т-лимфоцитов и увеличение относительного количества НК- и Т-НК-клеток у обследованных пациентов по сравнению со здоровыми донорами. Уменьшение $CD3^+CD19^-$ коррелирует с увеличением $CD3^+CD16^+CD56^+$. В раннем послеоперационном периоде изменений в иммунном статусе пациентов, по сравнению с показателями до операции, обнаружено не было.

Ключевые слова: ишемическая болезнь сердца, проточная цитометрия, иммунный статус

EVALUATION OF MAIN INDEXES OF IMMUNE STATE IN THE PATIENTS WITH PERCUTANEOUS TRANSLUMINAL CORONARY ANGIOPLASTY WITH STENTING

Shkoda O.S., Shilova A.N., Kozyreva V.S., Chernyavsky A.M.

Meshalkin State Research Institute of Blood Circulation Pathology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. The study included thirty-one patients with coronary heart disease before the procedure of percutaneous transluminal coronary angioplasty with stenting and the day after the surgery. Flow cytometric assays were performed in order to determine major subpopulations of peripheral lymphocytes ($CD3^+CD19^-$, $CD3^+CD19^+$, $CD3^+CD16^+CD56^+$, $CD3^+CD16^+CD56^-$). A statistically significant decrease in the relative amount of total T-lymphocytes and increased relative content of NK and NK-T-cells was revealed in the

Адрес для переписки:

Шкода Ольга Сергеевна
ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ 630055, Россия, г. Новосибирск, ул. Речкуновская, 15.
Тел.: 8 (983) 309-02-39.
E-mail: olgashkoda_nsk@mail.ru

Address for correspondence:

Shkoda Olga S.
Meshalkin State Research Institute of Blood Circulation Pathology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation 630055, Russian Federation, Novosibirsk, Rechkunovskaya str., 15.
Phone: 7 (983) 309-02-39.
E-mail: olgashkoda_nsk@mail.ru

Образец цитирования:

О.С. Шкода, А.Н. Шилова, В.С. Козырева, А.М. Чернявский, «Оценка основных показателей иммунного статуса у пациентов с чрескожной транслюминальной коронарной ангиопластикой со стентированием» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 171–176.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-171-176

© Шкода О.С. и соавт., 2016

For citation:

O.S. Shkoda, A.N. Shilova, V.S. Kozyreva, A.M. Chernyavsky, "Evaluation of main indexes of immune state in the patients with percutaneous transluminal coronary angioplasty with stenting", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 171–176.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-171-176

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-171-176>

patients under study when compared with healthy donors. The decrease in CD3⁺CD19⁻ subpopulation did correlate with increased CD3⁺CD16⁺CD56⁺ lymphocyte set. We have not found any significant changes of immune profile at the early terms post-surgery, when compared with appropriate results obtained pre-surgery.

Keywords: coronary artery disease, surgery, flow cytometry, immune profile

Введение

В настоящее время чрескожные коронарные вмешательства (ЧКВ) являются лидирующим методом реваскуляризации миокарда у больных ишемической болезнью сердца (ИБС). Тем не менее, по результатам многочисленных рандомизированных исследований выявлено, что коронарная ангиопластика и альтернативный хирургический метод лечения ИБС — аортокоронарное шунтирование (АКШ) — имеют как ряд преимуществ, так и недостатков с точки зрения долгосрочной эффективности и развития осложнений. Так, чрескожная транслюминальная коронарная ангиопластика (ЧТКА) имеет более высокий риск развития рестенозов [1]. В свою очередь, операция АКШ, как и любое хирургическое вмешательство, связана с высоким риском развития у пациентов ранних послеоперационных осложнений, в том числе и с возникновением состояния вторичного иммунодефицита, с последующим развитием инфекционно-воспалительных процессов. Поэтому при выборе метода лечения в случае равной эффективности реваскуляризации предпочтительным является метод ЧТКА как менее травматичный и не требующий длительного периода реабилитации. С другой стороны, ЧКВ, хоть и являются малоинвазивной процедурой, определенную степень воздействия на организм пациента оказывают.

В связи с этим **целью данного исследования** было изучить степень влияния процедуры на основные показатели иммунного статуса у пациентов после проведения ЧТКА.

Материалы и методы

Было проведено исследование основных субпопуляций лимфоцитов у 31 пациента с диагнозом ИБС (в возрасте от 43 до 78 лет; 24 мужчины, 7 женщин) до проведения ЧТКА со стентированием и через сутки после процедуры. В исследование не включались лица с хроническими инфекционными заболеваниями в фазе обострения и с наличием в анамнезе онкологических заболеваний.

В качестве контрольных образцов использовали периферическую кровь, полученную от 60 условно здоровых доноров (в возрасте от 38 до 62 лет; 45 мужчин, 15 женщин), обращавшихся в пункт переливания крови НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина.

Анализ абсолютного и относительного количества лимфоцитов периферической крови проводили на гематологическом анализаторе Sysmex. Типирование лимфоцитов периферической крови осуществлялось методом проточной цитометрии на приборе Navios (Beckman Coulter, США). Общие Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻); Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺); цитотоксические Т-лимфоциты (CD3⁺CD8⁺); В-лимфоциты (CD3⁻CD19⁺); NK-клетки (CD3⁻CD16⁺CD56⁺); Т-NK-клетки (CD3⁺CD16⁺CD56⁺); активированные Т-клетки (CD3⁺HLA-DR) — идентифицировали с помощью моноклональных антител, конъюгированных с различными флюорохромами: CD8-FITC, CD4-ECD, CD19-PC5, CD3-APC-A750, HLA-DR-PB, CD45-KrOr производства компании Beckman Coulter, США.

Для статистического анализа использовали программу Statistica 10.0. Проверка распределения случайных величин на нормальность осуществлялась критерием Шапиро—Уилка, проверка достоверности различий непараметрически распределенных величин производилась с использованием критерия Манна—Уитни, попарное сравнение производилось Т-критерием Вилкоксона для связанных выборок. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха Me (Q₂₅–Q₇₅). Для проведения корреляционного анализа использовался ранговый коэффициент Спирмена. Все различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При сравнении субпопуляционного состава лимфоцитов у обследованных пациентов (до проведения операции ЧТКА) с данными условно здоровых лиц мы получили статистически значимое снижение количества общих Т-клеток, повышение относительного количества популяции натуральных киллеров (NK), а также киллерных клеток, принадлежащих к Т-клеточной популяции (Т-NK) (табл. 1).

При проверке наличия связи между этими изменениями была выявлена сильная обратная корреляционная зависимость между относительным количеством CD3⁺CD19⁻ и CD3⁻CD16⁺CD56⁺ клеток ($r = -0,87$) (рис. 1).

Известно, что популяция NK-клеток гетерогенна, и их роль в распознавании и лизисе клеток-мишеней без предварительного контакта и последующей иммунизации осуществляется двумя

ТАБЛИЦА 1. ОСНОВНЫЕ СУБПОПУЛЯЦИИ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ПАЦИЕНТОВ ДО ОПЕРАЦИИ ЧТКА И УСЛОВНО ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ, Ме (Q_{25} – Q_{75})

Показатели		Относительное значение (%)		Абсолютное значение (*10 ⁹ /л)	
		обследованные пациенты	доноры	обследованные пациенты	доноры
Общее число лейкоцитов				6,6 (6,0-8,0)	5,2 (4,3-6,4)
Общее число лимфоцитов		31,1 (25,9-37,3)	32,6 (26,7-36,6)	2,1 (1,6-2,7)	1,6 (1,4-1,8)
основные субпопуляции лимфоцитов	Общие Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁻)	69,9* (64,6-77,4)	75,5 (69,9-80,2)	1,3 (0,924-1,64)	1,18 (1,08-1,4)
	Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺)	43,4 (37,0-48,6)	48,3 (42,1-54,9)	0,759 (0,639-0,99)	0,774 (0,63-0,963)
	цитотоксические Т-лимфоциты (CD3 ⁺ CD8 ⁺)	23,1 (20,2-30,8)	24,4 (19,1-28)	0,436 (0,297-0,612)	0,401 (0,305-0,523)
	В-лимфоциты (CD3 ⁺ CD19 ⁺)	9,2 (6,5-11,8)	12,6 (10,3-14)	0,135 (0,105-0,288)	0,204 (0,152-0,266)
	NK-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	17,9* (10,6-25,2)	11,3 (8-15,3)	0,287 (0,184-0,533)	0,174 (0,134-0,274)
	Т-NK-клетки (CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺)	5,8* (3,6-8,7)	2,3 (1,2-5)	0,092 (0,066-0,139)	0,043 (0,022-0,081)
	активированные Т-клетки (CD3 ⁺ HLA-DR)	6,4 (4,5-8,3)	5,1 (3,7-7,8)	0,109 (0,055-0,165)	0,15 (0,07-0,152)
индекс соотношения CD4 ⁺ /CD8 ⁺		1,8 (1,4-2,3)	1,9 (1,5-2,5)		

Примечание. * – $p < 0,05$.

основными субпопуляциями, которые определяются на основе относительной экспрессии CD16- и CD56-маркеров. Так, CD56^{dim}CD16⁺NK-клетки находятся преимущественно в периферической крови и обладают непосредственной цитотоксической активностью, тогда как CD56^{bright}CD16⁺NK-клетки находятся в основном в лимфоидных органах и продуцируют большое количество цитокинов [5, 7]. Поскольку функции натуральных киллеров и Т-лимфоцитов пересекаются, можно предположить, что повышение количества NK-клеток на фоне низкого содержания CD3⁺ клеток является компенсаторным для поддержания иммунного гомеостаза.

Т-NK-клетки представляют собой популяцию Т-клеток, экспрессирующих на своей поверхности маркеры натуральных киллеров CD16 и CD56. Эти клетки служат в качестве связующего звена между врожденным и приобретенным иммунитетом. После активации Т-NK-клетки быстро продуцируют и секретируют множество провоспалительных/противовоспалительных цитокинов, направляющих течение иммунной реакции [12]. В отличие от CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, Т-NK-клетки специфически реагируют на антигены гликолипидной структуры в комплексе с антигенпрезентирующими молекулами

CD1d (молекула, подобная главному комплексу гистосовместимости, MHC-like molecule). Т-NK делятся на две субпопуляции: инвариантные Т-NK (iNKT, I тип), экспрессирующие на поверхности постоянный $\alpha\beta$ Т-клеточный рецептор (TCR), α -цепь которого кодируется сегментом гена V α 24-J α 18, и Т-NK II типа, экспрессирующие различные TCR [8]. Т-NK-клетки участвуют в иммунном ответе организма при инфекционных, аутоиммунных, онкологических и аллергических заболеваниях [9, 13]. Причем роль киллерных клеток I и II типов при той или иной патологии различна. Большее значение, согласно исследованиям, придают инвариантным Т-NK. В частности, в исследованиях на мышах было показано, что iNKT могут играть ключевую роль в развитии некоторых воспалительных заболеваний, в том числе при травмах ишемии-реперфузии в разных органах. В одном из исследований на мышах было показано, что применение при ишемии печени агониста A_{2A} рецептора аденозина может ингибировать активацию Т-NK и продукцию ими IFN γ [10]. При этом отмечается, что из-за наличия аналогичной клеточной популяции инвариантных Т-NK подобный защитный механизм может существовать и в организме человека. В связи с этим можно предположить,

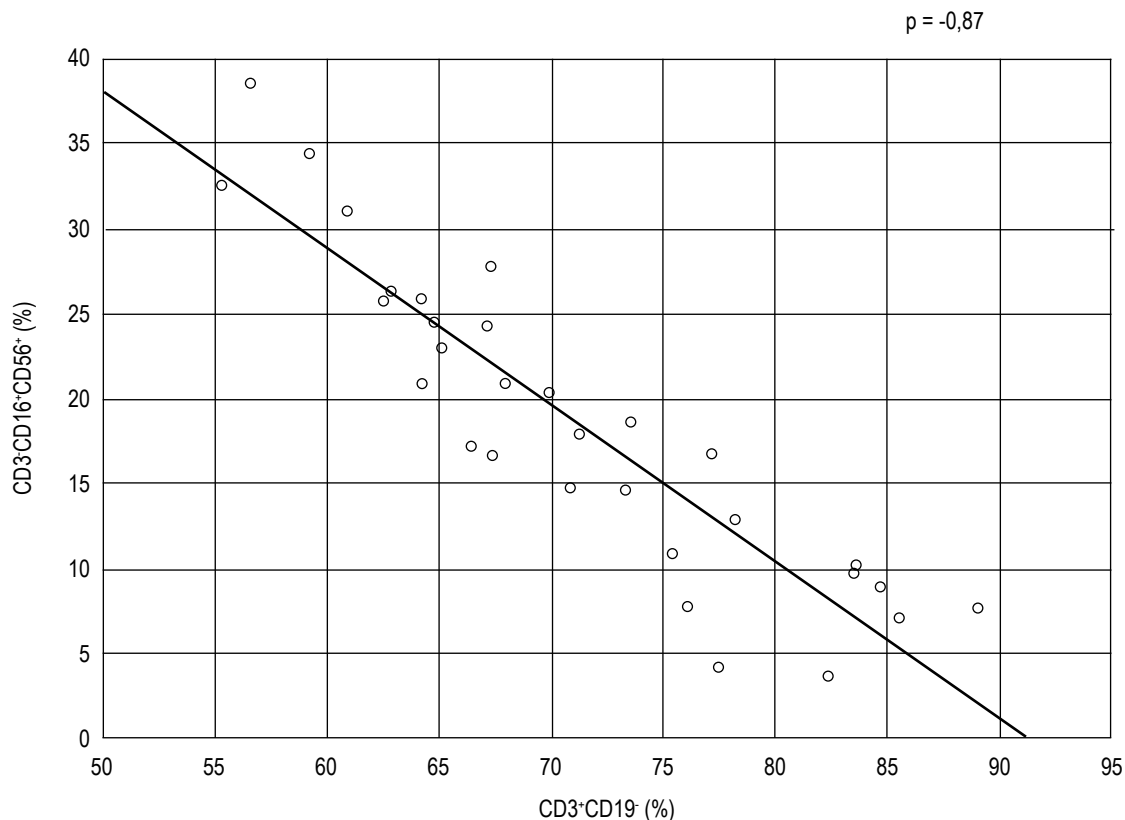


Рисунок 1. Зависимость относительного количества общих Т-лимфоцитов и НК-клеток

что повышенное содержание относительного количества Т-НК-клеток в группе обследованных пациентов, вероятно, является результатом локального воспалительного процесса, вызванного ишемией сердца.

Обнаруженные в группе обследованных больных изменения незначительны и не являются иммунодефицитными состояниями, а являются, скорее, результатом иммунных процессов, которые мы не можем оценить, используя стандартные методы исследования.

В результате проведенного исследования динамики относительного количества основных субпопуляций лимфоцитов статистически значимых различий не было получено ни по одному из показателей (табл. 2).

Учитывая комплексный анализ данных литературы по изучению влияния на иммунный статус пациентов хирургических вмешательств в целом и кардиохирургических в частности, подобный результат является закономерным.

Известно, что иммунодефицитное состояние разной степени выраженности вызывает практически любая хирургическая операция [4]. Многочисленными исследованиями подтверждено, что основными причинами развития такого состояния является дисбаланс между Th1-/Th2-путями развития иммунного ответа. Уровень выраженности иммунодепрессии зависит как от особен-

ностей самого хирургического вмешательства, так и исходного состояния пациента.

Так, при сравнении пациентов с протезированием дуги аорты и пациентов с АКШ в обеих группах было показано снижение общей популяции Т-лимфоцитов, Т-хелперов, снижение функциональной активности натуральных киллеров и Т-лимфоцитов на 3-й день после операции. Все эти изменения клеточного иммунитета были выражены значительно сильнее в группе пациентов с протезированием дуги аорты [11]. В исследованиях по влиянию общей продолжительности операции и длительности искусственного кровообращения (ИК) при кардиохирургических вмешательствах также была показана корреляционная зависимость между исследуемыми факторами и снижением относительного количества CD3⁺ и CD4⁺ лимфоцитов [2]. В аналогичном исследовании было показано, что характер реагирования иммунной системы и течение послеоперационного периода зависит не столько от продолжительности ИК, сколько от исходного состояния адапционно-приспособительных реакций пациентов [3].

Также сравнение оказываемых на иммунитет эффектов лапаротомических и лапароскопических способов хирургии доказало несомненное преимущество последних. Показано, что при

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ОТНОСИТЕЛЬНОГО КОЛИЧЕСТВА ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ, Ме (Q₂₅-Q₇₅)

Основные субпопуляции лимфоцитов	до ЧТКА	после ЧТКА
CD3 ⁺ CD19 ⁻ , %	69,9 (64,6-77,4)	73,1 (66,7-80,2)
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	43,4 (37,0-48,6)	44,9 (41,5-49,4)
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	23,1 (20,2-30,8)	25,0 (19,5-31,2)
CD3 ⁺ CD19 ⁺ , %	9,2 (6,5-11,8)	9,8 (6,7-12,7)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	17,9 (10,6-25,2)	16,3 (11,1-22,4)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ CD56 ⁺ , %	5,8 (3,6-8,7)	5,2 (3,4-8,9)
CD3 ⁺ HLA-DR, %	6,4 (4,5-8,3)	5,6 (4,2-8,5)
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,8 (1,4-2,3)	1,8 (1,4-2,4)

эндоскопических операциях происходит более значительный синтез IFN γ , что свидетельствует об активации Th1, чем при обычном оперативном вмешательстве, когда, наоборот, наблюдается активация Th2 и повышенный синтез IL-4, что приводит к преобладанию гуморального и недостаточности клеточного звена иммунитета и, как следствие, к послеоперационным инфекционным осложнениям [6].

Заключение

Таким образом, ЧКВ как малоинвазивные процедуры, при условии отсутствия у пациентов на момент операции иммунодефицитных состояний, оказывают минимальный эффект на состоя-

ние основных показателей иммунного статуса. При дальнейших исследованиях групп пациентов с подобными вмешательствами имеет смысл включить в рассмотрение не только состав и количество основных субпопуляций лимфоцитов, а также содержание малых (B1-, B2-, В-клетки памяти; $\gamma\delta$ T-клетки, Treg; NK-цитолитические и цитокинпродуцирующие) и активированных субпопуляций и их функциональную активность (продукцию цитокинов) с целью изучения механизмов их взаимодействия как при проведении малоинвазивных хирургических процедур, так и для более полной оценки исходного состояния поступающих на операцию пациентов с ИБС.

Список литературы / References

1. Кузнецова И.Э., Церетели Н.В. и др. Чрескожные коронарные вмешательства с использованием лекарственных стентов: прошлое, настоящее и будущее (обзор данных литературы) // Международный журнал интервенционной кардиоангиологии, 2013. № 32. С. 45-50. [Kuznetsova I.E., Tsereteli N.V. Percutaneous coronary intervention with the use of drug eluting stents: Past, Present and Future (review of the literature). *Mezhdunarodnyy zhurnal interventsionnoy kardioangiologii* = *International Journal of Interventional Cardiology*, 2013, no. 32, pp. 45-50. (In Russ.)]
2. Субботовская А.И., Козырева В.С., Князькова Л.Г. и др. Субпопуляционный состав лимфоцитов после кардиохирургических вмешательств в условиях искусственного кровообращения // Патология кровообращения и кардиохирургия, 2011. № 3. С. 47-50. [Subbotovskaya A.I., Kozyreva V.S., Knyazkova L.G. Subpopulations of lymphocytes after cardiac surgery under extracorporeal circulation. *Patologiya krovoobrashcheniya i kardiokhirurgiya* = *Circulation Pathology and Cardiac Surgery*, 2011, no. 3, pp. 47-50. (In Russ.)]
3. Турмова Е.П., Силаев А.А., Волков В.В. Особенности иммунного статуса у кардиохирургических больных с осложненным и неосложненным течением послеоперационного периода // Успехи современного естествознания, 2005. № 4. С. 71-73. [Turmova E.P. Silaev A.A., Volkov V.V. Features of the immune status of cardiac patients with complicated and uncomplicated postoperative period. *Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya* = *The Success of Modern Science*, 2005, no. 4, pp. 71-73. (In Russ.)]
4. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Изменение иммунитета при хирургических вмешательствах // Анналы хирургической гепатологии, 1998. Т. 3, № 2. С. 100-110. [Khaitov R.M., Pinegin B.V. Immunity alterations in surgical interventions. *Annaly khirurgicheskoy gepatologii* = *Annals of Surgical Hepatology*, 1998, Vol. 3, no. 2, pp. 100-110. (In Russ.)]

5. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunology*, 2001, no. 22, pp. 633-640.
6. Decker D., Schonendorf M., Bilingmaier F. et. al. Surgical stress induces a shift in the type-1/type-2 T-helper cell balance, suggesting down-regulation of cell-mediated and up-regulation of antibody-mediated immunity commensurate to the trauma. *Surgery*, 1996, no. 119, pp. 316-325.
7. Di Santo J.P. Functionally distinct NK-cell subsets: developmental origins and biological implications. *European Journal of Immunology*, 2008, no. 38, pp. 2948-2951.
8. Godfrey D.I., Stankovic S., Baxter A.G. Raising the NKT cell family. *Nature Immunology*, 2010, no. 11, pp. 197-206.
9. Kumar V., Delovitch T.L. Different subsets of natural killer T cells may vary in their roles in health and disease. *Immunology*, 2014, Vol. 142, no. 3, pp. 321-336.
10. Lappas C.M., Day Y.J., Marshall M.A., Engelhard V.H., Linden J. Adenosine A2A receptor activation reduces hepatic ischemia reperfusion injury by inhibiting CD1d-dependent NKT cell activation. *Journal of Experimental Medicine*, 2006, Vol. 203, no. 12, pp. 2639-2648.
11. Nakamura M., Kazui T., Morikawa M. et al. Depression of cellular immunity after aortic arch replacement. *Nihon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*, 1996, Vol. 44, no. 1, pp. 31-37.
12. Slauenwhite D., Johnston B. Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. *Frontiers in Immunology*, 2015, no. 6, p. 255.
13. Wu L., Kear L.V. Natural killer T cells in health and disease. *Frontiers in Bioscience*, 2011, no. 3, pp. 236-251.

Авторы:

Шкода О.С. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Шилова А.Н. — д.м.н., заведующая отделением лабораторной диагностики ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Козырева В.С. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории клинической иммунологии отделения лабораторной диагностики ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Чернявский А.М. — д.м.н., профессор, руководитель центра хирургии аорты, коронарных и периферических артерий ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт патологии кровообращения имени академика Е.Н. Мешалкина» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Shkoda O.S., Doctor (Clinical Laboratory Diagnostics), Laboratory of Clinical Immunology, Department of Laboratory Diagnostics, Meshalkin State Research Institute of Blood Circulation Pathology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Shilova A.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Laboratory Diagnostics, Meshalkin State Research Institute of Blood Circulation Pathology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Kozyreva V.S., Doctor (Clinical Laboratory Diagnostics), Laboratory of Clinical Immunology, Department of Laboratory Diagnostics, Meshalkin State Research Institute of Blood Circulation Pathology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Chernyavsky A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Center of Arterial Surgery, Meshalkin State Research Institute of Blood Circulation Pathology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 09.09.2015
Отправлена на доработку 02.12.2015
Принята к печати 04.12.2015

Received 09.09.2015
Revision received 02.12.2015
Accepted 04.12.2015

КОНЦЕНТРАЦИИ ИММУНОРЕГУЛЯТОРНЫХ БЕЛКОВ И НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В КРОВИ ЖЕНЩИН ПРИ ПРИЕМЕ МЕНОПАУЗАЛЬНОЙ ТЕРАПИИ

Зорина В.Н., Исакова О.В., Зорина Р.М., Баженова Л.Г., Зорин Н.А.

*ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства
здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия*

Резюме. Влияние препаратов менопаузальной гормональной и негормональной терапии на иммунный статус разнонаправленно, и зачастую результаты исследований противоречивы.

Цель работы состояла в комплексном изучении влияния препаратов менопаузальной гормональной и негормональной терапии на сыровоточные показатели некоторых иммунорегуляторных белков (альфа2-макроглобулина — а2-МГ и ассоциированного с беременностью альфа2-гликопротеина — АБГ) и взаимосвязанных с ними цитокинов (IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , IL-2), а также VEGF.

При приеме менопаузальной гормональной и негормональной терапии выявлено снижение сыровоточных уровней IL-6 вне зависимости от длительности приема и типа препарата. При динамическом наблюдении за женщинами, принимавшими менопаузальный гормональный препарат, содержащий 1 мг 17 β -эстрадиола и 5 мг дидрогестерона, и негормональный препарат, содержащий генистеин в дозе 60 мг, в течение 3–6 месяцев, выявлено статистически значимое снижение уровней IL-8 в сыворотке крови. Уровень VEGF был подвержен значительной индивидуальной вариабельности. Концентрации иммунорегуляторного а2-МГ были стабильны при климактерическом синдроме и не отличались от здоровых, однако содержание АБГ, обладающего выраженными иммуносупрессивными свойствами, повышалось в 3–4 раза у 33–50% женщин, принимавших менопаузальный гормональный препарат, независимо от дозы гестагена (5 и 10 мг дидрогестерона) и от длительности его использования.

Полученные данные свидетельствуют о необходимости индивидуализации подбора препаратов для минимизации риска возникновения иммунодефицитных состояний на фоне приема менопаузальной гормональной терапии.

Ключевые слова: альфа-2-макроглобулин, ассоциированный с беременностью альфа-2-гликопротеин, VEGF, цитокин, менопаузальная гормональная терапия, генистеин

Адрес для переписки:

Зорина Вероника Николаевна
ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный
институт усовершенствования врачей» Министерства
здравоохранения РФ
654005, Россия, г. Новокузнецк, пр. Строителей, 5.
Тел.: 8 (3843) 45-84-18.
E-mail: macroglobulin@yandex.ru

Address for correspondence:

Zorina Veronika N.
Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Ministry
of Healthcare of the Russian Federation
654005, Russian Federation, Novokuznetsk, Stroiteley ave, 5.
Phone: 7 (3843) 45-84-18.
E-mail: macroglobulin@yandex.ru

Образец цитирования:

В.Н. Зорина, О.В. Исакова, Р.М. Зорина, Л.Г. Баженова,
Н.А. Зорин, «Концентрации иммунорегуляторных белков
и некоторых цитокинов в крови женщин при приеме
менопаузальной терапии» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 2. С. 177–182.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-177-182

© Зорина В.Н. и соавт., 2016

For citation:

V.N. Zorina, O.V. Isakova, R.M. Zorina, L.G. Bazhenova,
N.A. Zorin, "Concentrations of immunoregulatory proteins and
some cytokines in blood of women during menopausal therapy",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 2, pp. 177–182.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-177-182

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-177-182>

CONCENTRATIONS OF IMMUNOREGULATORY PROTEINS AND SOME CYTOKINES IN BLOOD OF WOMEN DURING MENOPAUSAL THERAPY

Zorina V.N., Isakova O.V., Zorina R.M., Bazhenova L.G., Zorin N.A.

Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
Novokuznetsk, Russian Federation

Abstract. It has been shown that the influence of hormonal and non-hormonal therapy of menopausal syndrome upon immune profile may be variable, and the results of appropriate studies may be often contradictory. The aim of this work was to investigate the influence of hormonal and non-hormonal therapy in menopausal syndrome upon serum levels of some immunoregulatory proteins, i.e., alpha2-macroglobulin (a2-MG), pregnancy-associated alpha 2-glycoprotein (PAG), contents of some related cytokines (IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , IL-2) as well as VEGF amounts. Administration of menopausal hormone treatment and non-hormonal therapy was associated with reduced IL-6 levels in serum, regardless of treatment duration, or type of drug applied. We have found a statistically significant decrease of IL-8 serum levels in the course of dynamic monitoring in the women taking a menopausal hormone preparation containing 1 mg of 17 β -estradiol and 5 mg dydrogesterone, and a non-hormonal drug containing genistein (60 mg) for 3-6 months. The levels of VEGF demonstrated high individual variability during therapy of menopausal syndrome. Serum concentrations of immunoregulatory a2-MG were stable in climacteric syndrome, and did not differ from normal values. However, the content of PAG, a known immunosuppressive protein, was increased 3-4 times in serum of 33-50% of the women receiving menopausal hormonal therapy, regardless of progestogen dose (5 or 10 mg dydrogesterone), and duration of its use. These findings suggest a need for individualized drug selection in order to minimize a risk of immunodeficiency conditions in the patients receiving hormone therapy of menopausal syndrome.

Keywords: alpha2-macroglobulin, pregnancy associated alpha-2-glycoprotein, VEGF, cytokines, menopausal hormonal therapy, genistein

Введение

В нормально функционирующем организме ангиогенез контролируется и эндокринными, и паракринными факторами, тогда как одностороннее влияние гормональной терапии нарушает баланс и может способствовать патологической пролиферации. Известно, что под влиянием эстрогенов и прогестинов повышается экспрессия васкулярного эндотелиального фактора роста (VEGF) на стромальных клетках эндометрия [8]. Опосредованными ангиогенными свойствами, не связанными напрямую с VEGF, обладают TNF α , IL-1 β и IFN γ [8]. Однако данные по влиянию менопаузальной гормональной терапии (МГТ) на уровни цитокинов противоречивы: данные по снижению уровня IL-6 [5, 9], на фоне повышения содержания в крови TNF α [5] при МГТ, не подтверждаются результатами по 3-6 месячному приему женщинами гормональных препаратов, содержащих 17 β -эстрадиол [4, 10] либо фитоэстрогены [11]. В эксперименте на мышах установлено, что применение 17 β -эстрадиола или тиболона (анаболического стероида, обладающего эстрогенной, гестагенной и слабой андрогенной активностью) в течение 35 дней снижает уровни TNF α и IL-6 в крови [3, 6], что, по мнению авторов, связано с противовоспалительным

эффектом менопаузальной терапии. Однако известно, что подавление синтеза TNF α не только нейтрализует его возможный патогенный потенциал, но и блокирует защитные функции [13]. Крайне мало публикаций посвящено влиянию гормональной терапии на систему матриксных металлопротеиназ (ММП), участвующих в канцерогенезе, хотя установлено, что эстрогены в сочетании с IL-1 β активируют синтез ММП-3 [7]. И практически ничего не известно об изменениях иммуномодуляторных белков, активно участвующих и в пролиферации, и в ремоделировании тканей, в том числе за счет связывания и транспортировки, а также воздействия на синтез цитокинов, гормонов, липидов, ММП и других протеиназ. К числу данных белков относятся альфа-2-макроглобулин (a2-MG), а также его резервный аналог — ассоциированный с беременностью альфа2-гликопротеин (АБГ) с выраженными иммуносупрессивными свойствами и синтезом, активируемым избытком эстрогенов [1]. Ранее установлено, что в крови женщин, принимающих менопаузальную гормональную терапию, повышается уровень АБГ [2]. Однако сравнительных исследований содержания иммуnoreгуляторных белков и цитокинов в крови женщин, принимающих гормональную и негормональную терапию климактерических расстройств, не проводилось.

Целью данного исследования было изучение влияния различных схем МГТ на сывороточные уровни $\alpha 2$ -МГ, АБГ, VEGF и некоторых цитокинов.

Материалы и методы

Обследовано 100 женщин ($52 \pm 0,56$ лет) с климактерическим синдромом. Для купирования его клинических симптомов принимались варианты МГТ: 1) 1 мг 17β -эстрадиол + 5 мг дидрогестерон (22 женщины принимали препарат в динамике 3–6 месяцев и 29 женщин принимали данный препарат в течение 2–5 лет [группа сравнения]); 2) 1 мг 17β -эстрадиол + 10 мг дидрогестерон (10 женщин принимали 3–6 месяцев (в динамике) и 15 женщин — в течение 2–5 лет [группа сравнения]); 3) генистеин (негормональный препарат) в дозе 60 мг 24 женщины принимали в динамике 3–6 месяцев.

Группу контроля составили 10 практически здоровых женщин сопоставимого возраста ($50 \pm 0,7$ лет) без каких-либо клинических проявлений климактерического синдрома, не имевшие тяжелых хронических либо острых воспалительных заболеваний на момент обследования, а также пролиферативных заболеваний в анамнезе, не принимающие гормон-содержащие или иммунокорректирующие препараты. Информированное согласие на участие в исследовании получено у всех женщин.

Уровни эндотелиального фактора роста сосудов — VEGF, а также IL-6, IL-8, TNF α , IFN γ , IL-2 в сыворотке крови определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем (ЗАО «Вектор Бест», Россия). Сывороточные концентрации АБГ и $\alpha 2$ -МГ определяли методом количественного ракетного иммуноэлектрофореза с использованием исследовательских тест-систем, разработанных на базе НИЛ иммунологии ГБОУ ДПО НГИУВ и коммерческих каллибраторов.

Статистическая обработка результатов исследования проводилась с помощью лицензионной программы InStat-II (GraphPad, США). Использовалось парное межгрупповое сравнение показателей методами параметрической либо непараметрической статистики в зависимости от результатов проверки нормальности распределения признаков по критерию Колмогорова—Смирнова.

Результаты и обсуждение

Согласно полученным результатам (табл. 1), развитие климактерического синдрома не оказывает существенного влияния на сывороточные уровни большинства изученных иммунорегу-

ляторных белков и цитокинов (группы до лечения). Наличие IL-2 и IFN γ в крови методом ИФА не выявлялись как у здоровых доноров, так и при климактерических расстройствах. Однако в одной из трех групп женщин с климактерическим синдромом выявлен статистически значимо повышенный уровень IL-6 до начала лечения, по сравнению с контрольными значениями. При этом у данной группы женщин в 73% случаев (16 пациенток) наблюдалось умеренное и тяжелое течение климактерического синдрома.

Исследование динамики изменений на фоне купирования климактерического синдрома в течение 3–6 месяцев позволило установить, что у женщин, принимавших гормональный препарат, состоящий из 1 мг 17β -эстрадиол + 5 мг дидрогестерон (1 группа), а также у принимавших генистеин (3 группа) наблюдалось статистически значимое снижение концентраций IL-6 и IL-8. В группе женщин, принимавших гормональный препарат, состоящий из 1 мг 17β -эстрадиол + 10 мг дидрогестерон (2 группа), в динамике наблюдалось снижение сывороточного уровня только IL-6. Эти результаты совпадают с данными других авторов о снижении уровня IL-6 в крови женщин, принимающих МГТ [5, 9].

При длительном приеме гормональных препаратов (2–5 лет) у женщин группы сравнения сывороточный уровень IL-6 также был значимо снижен при приеме менопаузальных препаратов, содержащих 1 мг эстрадиол + 5 мг дидрогестерон либо 1 мг 17β -эстрадиол + 10 мг дидрогестерон. Концентрации IL-8 не отличались значимо от показателей контрольной группы.

Необходимо отметить, что в целом уровни IL-6 и IL-8 у принимающих как гормональные, так и негормональные препараты для купирования климактерического синдрома не выходили за пределы нормативных значений, установленных для здоровых доноров региона. Однако, учитывая, что IL-6 является иммуномодулятором, активно участвующим и в физиологических и в патологических процессах, системное подавление его синтеза при лечении климактерического синдрома может оказывать негативное влияние на локальный взаимозависимый синтез других цитокинов и белков в эстроген-зависимых тканях, повышая риск развития патологической пролиферации. Известно, что МГТ гормон-содержащими препаратами повышает риск развития рака молочной железы [12], хотя, по другим данным, МГТ препаратами, содержащими 17β -эстрадиол, ассоциируется со снижением частоты рака желудка [9], однако патогенетические механизмы влияния препаратов на онкопролиферацию точно не установлены.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ (пкг/мл), АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА (А2-МГ) И АССОЦИИРОВАННОГО С БЕРЕМЕННОСТЬЮ АЛЬФА-2-ГЛИКОПРОТЕИНА (АБГ) В г/л В КРОВИ ЖЕНЩИН, ПРИНИМАВШИХ МЕНОПАУЗАЛЬНУЮ ГОРМОНАЛЬНУЮ И НЕГОРМОНАЛЬНУЮ ТЕРАПИЮ

Группы обследованных			TNF α	IL-6	IL-8	VEGF	α 2-МГ	АБГ
Контроль			0	2,5 $\pm$ 0,1	4,5 $\pm$ 1,4	315 $\pm$ 53	2,35 $\pm$ 0,16	0,013 $\pm$ 0,003
1 мг 17 β -эстрадиол + 5 мг дидрогестерон	в динамике	до	0	5,4 $\pm$ 0,2 $p < 0,0001$	5,1 $\pm$ 0,5	291 $\pm$ 50	2,24 $\pm$ 0,07	0,013 $\pm$ 0,002
		3-6 мес.	1,0 $\pm$ 0,8	0,9 $\pm$ 0,3 $p < 0,0001$ $p_1 < 0,0001$	3,0 $\pm$ 0,7 $p_1 = 0,019$	346 $\pm$ 49	2,18 $\pm$ 0,05	а) 67% 0,014 $\pm$ 0,002 б) 33% 0,044 $\pm$ 0,003 $p_1 < 0,0001$
	сравнение	2-5 лет	0,4 $\pm$ 0,2	0,5 $\pm$ 0,2 $p < 0,0001$	3,4 $\pm$ 0,7	325 $\pm$ 40	2,17 $\pm$ 0,07	а) 55% 0,015 $\pm$ 0,002 б) 45% 0,050 $\pm$ 0,004 $p < 0,0001$
		2-5 лет	0	1,4 $\pm$ 0,4 $p = 0,006$	5,7 $\pm$ 3,7	281 $\pm$ 116	2,35 $\pm$ 0,17	а) 67% 0,012 $\pm$ 0,003 б) 33% 0,056 $\pm$ 0,01 $p < 0,0001$
1 мг 17 β -эстрадиол + 10 мг дидрогестерон	в динамике	до	0	1,2 $\pm$ 0,6	4,5 $\pm$ 0,8	286 $\pm$ 82	2,25 $\pm$ 0,10	0,019 $\pm$ 0,004
		3-6 мес.	0	1,3 $\pm$ 0,8 $p = 0,03$	5,8 $\pm$ 2,2	292 $\pm$ 50	2,25 $\pm$ 0,08	а) 50% 0,017 $\pm$ 0,003 б) 50% 0,057 $\pm$ 0,006 $p_1 = 0,0003$
	сравнение	2-5 лет	0	1,4 $\pm$ 0,4 $p = 0,006$	5,7 $\pm$ 3,7	281 $\pm$ 116	2,35 $\pm$ 0,17	а) 67% 0,012 $\pm$ 0,003 б) 33% 0,056 $\pm$ 0,01 $p < 0,0001$
		2-5 лет	0	1,4 $\pm$ 0,4 $p = 0,006$	5,7 $\pm$ 3,7	281 $\pm$ 116	2,35 $\pm$ 0,17	а) 67% 0,012 $\pm$ 0,003 б) 33% 0,056 $\pm$ 0,01 $p < 0,0001$
Генистеин 60 мг	в динамике	до	0	4,6 $\pm$ 1,4	7,6 $\pm$ 0,9	326 $\pm$ 50	2,18 $\pm$ 0,11	0,012 $\pm$ 0,002
		3-6 мес.	0	1,3 $\pm$ 0,7 $p_1 = 0,040$	5 $\pm$ 1 $p_1 = 0,004$	289 $\pm$ 36	2,27 $\pm$ 0,12	а) 100% 0,01 $\pm$ 0,001

Примечание. Указаны только статистически достоверные различия: p – с контролем; p_1 – в группах до и через 3-6 месяца лечения. Группы дополнительно разделены на подгруппы с содержанием АБГ в пределах нормы: а) $\leq 0,029$ г/л и с повышенным, б) $\geq 0,030$ г/л на фоне лечения, с указанием процента выявления от общего количества женщин в группе.

Содержание фактора роста VEGF в крови всех обследованных женщин было подвержено большой индивидуальной вариабельности, вне зависимости от вида принимаемых препаратов и длительности их приема, что не позволило, в ряде случаев, подтвердить статистическую значимость изменений. Можно предположить, что МГТ вносит определенный дисбаланс в синтез VEGF, активно участвующего в развитии патологической пролиферации, о чем свидетельствует широкий разброс показателей, выявленный в нашем исследовании, и описанная другими авторами ак-

тивация его экспрессии на тканях эндометрия при применении гормональных стероидов [8].

Наличие TNF α не обнаруживалось в крови у подавляющего большинства женщин как до начала применения препарата, так и после, статистически значимых изменений не выявлено. Наличие IL-2 и IFN γ в циркуляции не выявлялось методом ИФА.

Концентрации иммуномодуляторного альфа2-макроглобулина, синтез которого взаимосвязан с синтезом IL-6 [1], были стабильны у женщин с климактерическим синдромом,

не отличались от контрольных показателей, не зависели от вида принимаемого препарата МГТ и длительности его использования.

Напротив, при изучении уровней ассоциированного с беременностью альфа2-гликопротеина у женщин, принимавших менопаузальные гормональные препараты, результаты разделились на 2 подгруппы: а) МГТ без существенного повышения содержания АБГ в крови (до 0,029 г/л); б) МГТ с повышением уровней АБГ ($\geq 0,030$ г/л), в среднем в 3–4 раза, при сравнении с контрольными данными. Количество женщин с повышенным АБГ в группах было от 33 до 50% случаев, как при коротком приеме (не более 3–6 месяцев), так и при длительном приеме гормональных препаратов (2–5 лет), независимо от дозы гестагена. Эти данные совпадают с сообщениями о стабильном повышении уровней АБГ в крови у 17–45% женщин, принимающих гормональные препараты, содержащие 17 β -эстрадиол [2]. Однако применение растительных аналогов гормонов (генистеин) для купирования симптомов климактерического синдрома не приводило к увеличению концентраций АБГ в сравнении с данными до приема и результатами в контрольной группе.

Необходимо отметить, что АБГ является резервным аналогом а2-МГ, его синтез активируется при беременности, а также патологической пролиферации в эстроген-зависимых органах — АБГ относят к ранним неспецифическим маркерам онкопролиферации [1]. Отчасти повышением его уровней можно объяснить снижение концентраций IL-6 и IL-8 в крови при МГТ, поскольку АБГ влияет на их синтез и обладает выраженными иммуносупрессивными свойствами [1]. Мы предполагаем, что повышение уровней АБГ в крови некоторых женщин, принимающих гормональные препараты, является следствием повышенной индивидуальной чувствительности эстрогеновых рецепторов — у некоторых женщин даже небольшое количество экзогенных гормонов приводило

к активации эстроген-зависимого синтеза АБГ, иммуносупрессии, подавлению активности синтеза некоторых цитокинов и VEGF, что повышает риск развития патологической пролиферации. И, напротив, 50–70% женщин длительно принимали МГТ без какого-либо ущерба для показателей врожденного иммунитета.

Таким образом, результаты нашего исследования позволяют индивидуализировать подбор препаратов МГТ с изначальным выявлением группы потенциального риска и назначением негормональных вариантов терапии, что позволит, при максимальном сохранении терапевтического эффекта препаратов, минимизировать их негативное воздействие на иммунный статус женщин.

Выводы

1. При приеме менопаузальной гормональной и негормональной терапии наблюдается снижение сывороточных уровней IL-6 вне зависимости от длительности приема и типа препарата.

2. Снижение сывороточных уровней IL-8 наблюдается только в динамике первого полугодия приема в группе женщин, принимавших генистеин, и у женщин, принимавших препарат, содержащий 1 мг 17 β -эстрадиол + 5 мг дидрогестерон.

3. Уровни фактора роста VEGF при приеме менопаузальной гормональной и негормональной терапии подвержены значительной индивидуальной вариативности вне зависимости от типа препарата и дозировки его составляющих.

4. При приеме МГТ уровень иммунорегуляторного МГ в крови стабилен, однако уровень иммуносупрессивного АБГ повышается у 33–50% женщин в 3–4 раза, вне зависимости от длительности приема препаратов.

5. Индивидуализация подбора препаратов МГТ, с учетом уровней АБГ, позволит минимизировать количество иммунодефицитных состояний при сохранении терапевтического эффекта.

Список литературы / References

1. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль белков семейства макроглобулинов в регуляции опухолевого роста (Обзор литературы) // Онтогенез, 2006. Т. 37, № 1. С. 12–19. [Zorin N.A., Zorina V.N., Zorina R.M. Role of proteins of the macroglobulin family in regulation of tumor growth. *Ontogenez = Ontogenesis*, 2006, Vol. 37, no. 1, pp. 12–19. (In Russ.)]
2. Зорина В.Н., Предеина Е.М., Зорина Р.М., Левченко В.Г., Баженова Л.Г., Зорин Н.А. Уровень ассоциированного с беременностью альфа-2-гликопротеина и гормональный фон при разных типах заместительной гормональной терапии климактерического синдрома // Клиническая лабораторная диагностика, 2007. № 7. С. 24–27. [Zorina V.N., Predeina E.M., Zorina R.M., Levchenko V.G., Bazhenova L.G., Zorin N.A. The level of pregnancy-associated alpha2-glycoprotein and the hormonal background during different options of hormonal replacement therapy in the menopausal syndrome. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2012, Vol. 7, pp. 24–27. (In Russ.)]

3. De Medeiros A.R., Lamas A.Z., Caliman I.F., Dalpiaz P.L., Firmes L.B., de Abreu G.R., Moyses M.R., Lemos E.M., dos Reis A.M., Bissoli N.S. Tibolone has anti-inflammatory effects in estrogen-deficient female rats on the natriuretic peptide system and TNF-alpha. *Regul. Pept.*, 2012, Vol. 10, no. 179 (1-3), pp. 55-60.
4. Edwards K.M., Mills P.J. Effect of estrogen versus estrogen and progesterone on cortisol and interleukin-6. *Maturitas*, 2008, Vol. 20, no. 61 (4), pp. 330-333.
5. Eilertsen A.L., Sandvik L., Steinsvik B., Sandset P.M. Differential impact of conventional-dose and low-dose postmenopausal hormone therapy, tibolone and raloxifene on C-reactive protein and other inflammatory markers. *J. Thromb. Haemost.*, 2008, Vol. 6, no. 6, pp. 928-934.
6. Gomez C.R., Plackett T.P., Kovacs E.J. Aging and estrogen: modulation of inflammatory responses after injury. *Exp. Gerontol.*, 2007, Vol. 42, no. 5, pp. 451-456.
7. Grandas O.H., Mountain D.J., Kirkpatrick S.S., Rudrapatna V.S., Cassada D.C., Stevens S.L., Freeman M.B., Goldman M.H. Effect of hormones on matrix metalloproteinases gene regulation in human aortic smooth muscle cells. *Surg Res.*, 2008, Vol. 148, no.1, pp. 94-99.
8. Lebovic D.I., Shifren J.L., Ryan I.P., Mueller M.D., Korn A.P., Darney P.D., Taylor R.N. Ovarian steroid and cytokine modulation of human endometrial angiogenesis. *Hum. Reprod.*, 2000, Vol. 15, Suppl. 3, pp. 67-77.
9. Liu C.J., Kuo F.C., Hu H.M., Chen C.Y., Huang Y.B., Cheng K.H., Yokoyama K.K., Wu D.C., Hsieh S., Kuo C.H. 17 β -Estradiol inhibition of IL-6-Scr and Cas and paxillin pathway suppresses human mesenchymal stem cells-mediated gastric cancer cell motility. *Transl Res.*, 2014, Vol. 164, no. 3, pp. 232-243.
10. Ma L.J., Guzman E.A., DeGuzman A., Muller H.K., Walker A.M., Owen L.B. Local cytokine levels associated with delayed-type hypersensitivity responses: modulation by gender, ovariectomy, and estrogen replacement. *J. Endocrinol.*, 2007, Vol. 193, no. 2, pp. 291-297.
11. Pineda B., Garcia-Perez M.A., Vazquez F., Julia M.D., Tarin J.J., Hermenegildo C., Cano A. No effect of Cimicifuga racemosa extract on serum interleukin-6 levels and prostacyclin production by human endothelial cells. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2009, Vol. 144, no. 1, pp. 93-94.
12. Tazhibi M., Dehghani M., Babazadeh S., Makkarian F., Tabatabaieian M., Sadeghi M., Rezaei P., Faghihi M. Hormonal and reproductive risk factors associated with breast cancer in Isfahan patients. *J. Educ. Health Promot.*, 2014, Vol. 23, no. 3, p. 69.
13. Winsauer C., Kruglov A.A., Chashchina A.A., Drutskaya M.S., Nedospasov S.A. Cellular sources of pathogenic and protective TNF and experimental strategies based on utilization of TNF humanized mice. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2014, Vol. 25, no. 2, pp. 115-123.

Авторы:

Зорина В.Н. — д.б.н., главный научный сотрудник, научно-исследовательская лаборатория иммунологии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Исакова О.В. — ассистент кафедры акушерства и гинекологии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Зорина Р.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник, научно-исследовательская лаборатория иммунологии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Баженова Л.Г. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой акушерства и гинекологии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Зорин Н.А. — д.б.н., профессор, заведующий научно-исследовательской лабораторией иммунологии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

Authors:

Zorina V.N., PhD, MD (Biology), Main Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russian Federation

Isakova O.V., Assistant Professor, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russian Federation

Zorina R.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russian Federation

Bazhenova L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Obstetrics and Gynecology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russian Federation

Zorin N.A., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Research Laboratory of Immunology, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Novokuznetsk, Russian Federation

Поступила 21.10.2015
Принята к печати 07.12.2015

Received 21.10.2015
Accepted 07.12.2015

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ РОЛЬ КОФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ Id2 ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н.

ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика
И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Цель исследования — оценка вклада репрессивного кофактора транскрипции Id2 (inhibitor of DNA-binding 2) в патогенезе бронхиальной астмы (БА). Обследовали 6 практически здоровых лиц и 9 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 24 — неаллергической БА (НАБА). Экспрессию мРНК Id2 оценивали путем проведения RT-PCR.

Значимой разницы в экспрессии мРНК Id2 в лимфоцитах при БА и у здоровых лиц не зарегистрировано. Корреляционный анализ выявил значимую прямую связь уровня экспрессии мРНК Id2 с уровнем экспрессии мРНК фермента AID и количеством эозинофилов периферической крови при АБА. У здоровых лиц наблюдается сильная прямая связь экспрессии мРНК Id2 как с содержанием IgE в сыворотке, так и с уровнем экспрессии мРНК его тяжелых цепей (ε-цепей).

У больных БА, вероятно, имеется дефект реализации функций репрессивного кофактора транскрипции ID2, что в итоге ведет к нарушению негативного контроля за экспрессией фермента AID, участвующего в переключении В-лимфоцитов на синтез IgE.

Ключевые слова: бронхиальная астма, Id2, транскрипция, иммуноглобулин E, лимфоциты

A PATHOGENETIC ROLE OF TRANSCRIPTION COREPRESSOR Id2 IN BRONCHIAL ASTHMA

Mineev V.N., Nyoma M.A., Sorokina L.N.

The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation,
St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of present study was to evaluate a possible role of Id2 (inhibitor of DNA-binding 2) in pathogenesis of bronchial asthma (BA). We have examined six healthy control persons, nine patients with allergic bronchial asthma (ABA) and twenty-four patients with non-allergic bronchial asthma (NABA). The Id2 mRNA expression was evaluated by means of real-time PCR.

No significant differences in Id2 mRNA expression levels were revealed between the control and asthma groups. Correlation analysis of Id2 mRNA expression has revealed significant positive correlation with AID

Адрес для переписки:

Минеев Валерий Николаевич
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
198516, Россия, Санкт-Петербург-Петродворец,
Санкт-Петербургский пр., 56, кв.15.
Тел.: 8 (812) 450-71-63, 8 (921) 359-62-95.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Address for correspondence:

Mineev Valeriy N.
The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University,
Ministry of Healthcare of the Russian Federation
198516, Russian Federation, St. Petersburg-Petrodvorets,
Sankt-Peterburgskiy pr., 56, apt 15.
Phone: 7 (812) 450-71-63, 7 (921) 359-62-95.
E-mail: vnmineev@mail.ru

Образец цитирования:

В.Н. Минеев, М.А. Нёма, Л.Н. Сорокина,
«Патогенетическая роль кофактора транскрипции Id2
при бронхиальной астме» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 2. С. 183–186.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-183-186

© Минеев В.Н. и соавт., 2016

For citation:

V.N. Mineev, M.A. Nyoma, L.N. Sorokina, "A pathogenetic role
of transcription corepressor Id2 in bronchial asthma", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 2, pp. 183–186.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-183-186

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-183-186>

(activation-induced cytidine deaminase) mRNA levels and peripheral blood eosinophil contents in ABA. Healthy persons demonstrate strong positive correlation between Id2 mRNA expression and serum IgE levels, like as with ϵ -chain mRNA contents.

It was suggested that the Id2 dysfunction may take place in the BA patients. These changes affect negative control over the AID expression, which is important for switching B-cells to IgE production.

Keywords: bronchial asthma, Id2, transcription, immunoglobulin E, lymphocytes

Работа частично поддержана грантом СПбГМУ им. акад. И.П. Павлова 2012 года для инновационных исследований.

Введение

Как известно, одним из ключевых элементов патогенеза бронхиальной астмы (БА) является иммуноглобулин (IgE). Открытый в 1999 году фермент AID (AICDA – activation-induced [cytidine] deaminase – индуцируемая активацией цитидиновая деаминаза) необходим для инициации процесса переключения В-лимфоцитов с продукции IgM на синтез других классов антигенов, в частности IgE [4].

Ранее мы уже рассматривали роль AID в патогенезе бронхиальной астмы [1].

Транскрипция гена AID контролируется факторами E2A и PAX-5 [3] и корепрессором Id2. Кофакторы семейства Id (inhibitors of DNA binding – ингибитор ДНК-связывания) не имеют ДНК-связывающих доменов, однако, могут связываться с транскрипционными факторами

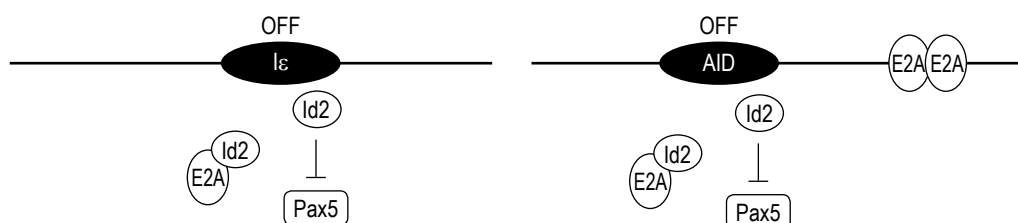
ми, угнетая их возможность связываться с ДНК. В частности, Id2 может препятствовать присоединению E2A и PAX-5 к своим сайтам связывания в промоторе гена AID (рис. 1). Целью нашей работы была оценка вклада Id2 в патогенез БА.

Материалы и методы

Обследовано 6 практически здоровых лиц, 9 больных аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 24 – неаллергической БА (НАБА) различной тяжести течения.

Все обследованные больные БА находились в клинике госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ПСПбГМУ имени академика И.П. Павлова. Проводили комплексное клиничко-лабораторное и инструментальное обследование, включавшее общеклинические методы, цитологический и бактериологический

Покоящаяся В-клетка



Активированная В-клетка

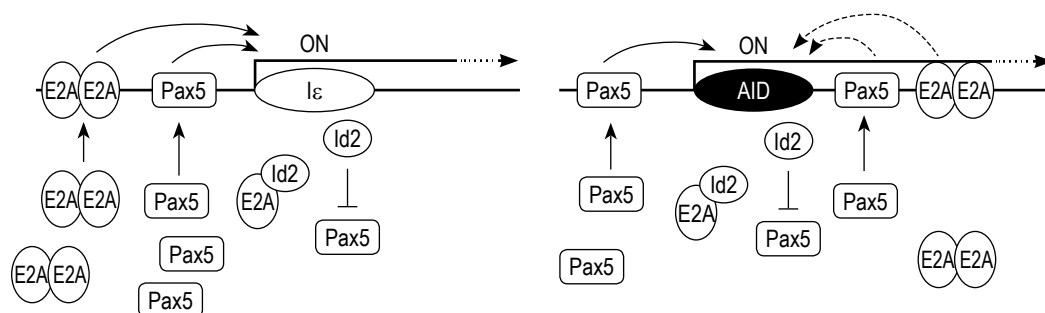


Рисунок 1. Предполагаемая регуляция экспрессии генов AID и IgE транскрипционными факторами E2A, PAX-5 и кофактором Id2 [3]

Примечание. В неактивированном В-лимфоците Id2 блокирует связывание транскрипционных факторов E2A и PAX-5 с промоторами генов тяжелых цепей IgE (I ϵ) и AID, и их транскрипция не происходит (OFF).

При активации в В-клетке возрастает количество E2A и PAX-5, и изначального количества Id2 недостаточно для блокирования связывания транскрипционных факторов с ДНК. E2A и PAX-5 присоединяются к своим сайтам связывания в промоторах генов тяжелых цепей IgE и AID и иницируют их транскрипцию (ON).

анализы мокроты, а также аллергологическое исследование. Все участники подписали форму информированного согласия. В обследованных группах проводили исследование функции внешнего дыхания. Диагноз устанавливали и проводили лечение в соответствии с критериями и стандартами международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (GINA, 2012). Для исследования использовали лимфоциты периферической крови здоровых лиц и больных БА, выделенные на градиенте плотности Lymphoseparation Medium («ICN») с использованием стандартной методики выделения мононуклеаров с последующим удалением моноцитов с осаждением на пластике в условиях инкубации в среде IMDM при 37 °C в течение 40 мин.

RT-PCR. Экспрессию мРНК AID оценивали путем проведения RT-PCR (reverse transcription-PCR – обратная транскрипция – полимеразная цепная реакция [ПЦР]) с нуклеиновыми кислотами, выделенными из лимфоцитов периферической крови. ПЦР проводили в амплификаторе «iCycler» (BIORAD) в следующем режиме: инициация при 95 °C в течение 4-х мин, 30 циклов денатурации при 95 °C в течение 30 с, отжига при 60 °C в течение 30 с и полимеризации при 70 °C в течение 30 с. Завершающую полимеризацию проводили при 72 °C в течение 7 мин. Продукты амплификации подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле и окраске этидия бромидом. Результат электрофореза после фотографирования в ультрафиолетовом свете анализировали в программе Gel-Pro 3.1. Уровень экспрессии мРНК Id2 и AID и тяжелых цепей IgE (эпсилон-цепей) оценивали относительно уровня β-актина.

Праймеры для Id2, AID и β-актина были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank). (Id2 5': 5'- CCC aGA ACA aga Agg TGA GC-3' и Id2 3': 5'- AAT TCA GAA GCC TGC AAG GA-3'; AID 5': 5'- gga act tgg aga ggg agc tt-3' и AID 3': 5'- ggc tct acc tgg ctg ttc tg-3'; β-актин

5': 5'-TCC TGT GGC ATC CAC GAA ACT-3' и β-актин 3': 5'-GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT-3').

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью программы SPSS 13.0 с использованием методов и критериев непараметрической статистики при малом значении числа наблюдений: критериев Вилкоксона, Манна–Уитни, коэффициента корреляции Спирмена.

Результаты и обсуждение

Рассмотрим, как распределена экспрессия мРНК Id2 в группах больных БА и практически здоровых лиц (табл. 1).

Как видно из таблицы 1, нет значимой разницы в экспрессии мРНК Id2 в лимфоцитах при БА и у здоровых лиц.

Уровни экспрессии мРНК Id2 значимо коррелируют с количеством эозинофилов периферической крови (ρ Спирмена = 0,717; $n = 9$; $p = 0,03$) у больных аллергической БА, в то же время подобной закономерности не отмечалось у больных неаллергическим вариантом заболевания и у здоровых лиц (ρ Спирмена = -0,279; $n = 24$; $p = 0,186$ и ρ Спирмена = -0,486; $n = 6$; $p = 0,329$).

Учитывая влияние Id2 на экспрессию AID, мы проанализировали связь экспрессии мРНК этих двух факторов. У больных БА эта корреляция оказалась значимо сильной (ρ Спирмена = 0,882; $n = 15$; $p < 0,01$). Такое однонаправленное изменение экспрессии, на наш взгляд, может быть объяснено предположительно наличием специфической обратной связи: при низких концентрациях белка Id2 увеличивается продукция мРНК AID, высокие уровни которой, вероятно, запускают процесс синтеза мРНК Id2. Отсутствие такой закономерности в группе здоровых лиц позволяет предположить наличие дефекта негативного контроля за экспрессией AID при БА, который, вероятно, имеет место на уровне

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК Id2 В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ (ИНТЕГРИРОВАННАЯ ПЛОТНОСТЬ ПО ОТНОШЕНИЮ К β-АКТИНУ) (МЕДИАНА И КВАРТИЛИ)

Группа обследования	Значение	Значимость различий*
Контрольная группа (практически здоровые лица) $n = 6$ (1)	0.80 (0,54;1,10)	1-2: $p > 0,05$ 2-3: $p > 0,05$ 1-3: $p > 0,05$
Больные АБА $n = 9$ (2)	0.60 (0,40;1,50)	
Больные НАБА $n = 24$ (3)	0.88 (0,60;1,11)	

Примечание. * – уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения выборок использован критерий Геймса–Хоуэлла).

трансляции Id2 (то есть на стадии синтеза белка на матрице РНК).

Интересно, что, в отличие от больных БА, у здоровых лиц наблюдается сильная прямая связь экспрессии мРНК Id2 как с содержанием IgE в сыворотке, так и с уровнем экспрессии мРНК его тяжелых цепей (ϵ -цепей) (r Спирмена = 0,9; $n = 5$; $p = 0,037$). Возможно, это связано с общим регулятором экспрессии как мРНК ϵ -цепей, так и мРНК Id2.

Ранее мы предполагали, что таким регулятором может являться транскрипционный фактор STAT6 [2], последовательность для связывания которого присутствует в нетранслируемой части гена Id2.

Отсутствие подобной закономерности при БА, вероятно, обусловлено нарушением контроля со стороны STAT6 за транскрипцией ϵ -цепей, за счет дисбаланса в сети транскрипционных

факторов, регулирующих продукцию этих частей IgE [2].

Также с активностью STAT6 может быть связана и выявленная положительная корреляция уровней экспрессии мРНК Id2 с эозинофилией периферической крови при аллергической БА: STAT6 стимулирует дифференцировку Т-лимфоцитов в Т-хелперы 2-го типа, продуцирующие IL-5, активирующий эозинофилы.

В заключение можно отметить, что у больных БА, вероятно, имеется дефект реализации функций репрессивного кофактора транскрипции Id2, что в итоге ведет к нарушению негативного контроля за экспрессией AID, обеспечивающей переключение В-лимфоцитов на синтез IgE. Изучение концентрации белка Id2 позволит глубже понять механизмы негативного контроля в патогенезе БА.

Список литературы / References

1. Минеев В.Н., Нёма М.А., Сорокина Л.Н. Экспрессия мРНК фермента AID в лимфоцитах периферической крови при бронхиальной астме // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 71-74. [Mineev V.N., Nyoma M.A., Sorokina L.N. Expression of AID-specific mRNA in peripheral blood lymphocytes in bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 71-74. doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-71-74 (In Russ.)]
2. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нёма М.А., Еремеева А.В. Взаимодействие транскрипционных факторов PAX-5 и STAT6 в патогенезе аллергической бронхиальной астмы // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 1. С. 35-42. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Nyoma M.A., Eremeeva A.V. Interactions of transcription factors PAX-5 and STAT6 in pathogenesis of allergic bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 1, pp. 35-42. doi: 10.15789/1563-0625-2014-1-35-42 (In Russ.)]
3. Muramatsu M., Sankaranand V.S., Anant S., Sugai M., Kinoshita K., Davidson N.O., Honjo T. Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 1999, no. 274, pp. 18470-18476.
4. Gonda H., Sugai M., Nambu Y., Katakai T., Agata Y., Mori K.J., Yokota Y., Shimizu A. The balance between Pax5 and Id2 activities is the key to AID gene expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 2003, no. 198, pp. 1427-1437.

Авторы:

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Сорокина Л.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Нёма М.А. — к.м.н., ассистент, кафедра госпитальной терапии имени академика М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Mineev V.N., PhD, MD (Medicine), Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Sorokina L.N., PhD, MD (Medicine), Assistant Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Nyoma M.A., PhD (Medicine), Associate Professor, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 04.10.2015

Принята к печати 07.12.2015

Received 04.10.2015

Accepted 07.12.2015

СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ ЛИМФОЦИТОВ У МОЛОДЫХ МУЖЧИН С МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Сумеркина В.А., Телешева Л.Ф., Головнева Е.С., Квятковская С.В.,
Дворчик Е.Е.

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

Резюме. Метаболический синдром представляет собой субклинический хронический воспалительный процесс. Литературные данные о состоянии иммунного статуса при метаболическом синдроме неоднозначны. Кроме того, гендерные особенности метаболического синдрома освещены недостаточно. Цель исследования — определить особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у молодых мужчин с метаболическим синдромом и сочетанием абдоминального ожирения с артериальной гипертензией. В исследование было включено 77 мужчин в возрасте 20–45 лет. Мужчины были распределены на 4 группы, сопоставимые по возрасту: 1 группа — контрольная группа (практически здоровые мужчины); 2 группа — мужчины с изолированным абдоминальным ожирением; 3 группа — мужчины с сочетанием абдоминального ожирения и артериальной гипертензии; 4 группа — мужчины с метаболическим синдромом. Методом проточной цитометрии были выделены и проанализированы субпопуляции лимфоцитов: Т-лимфоциты, Т-хелперы, Т-цитотоксические, ТНК-лимфоциты, НК-лимфоциты, В-лимфоциты, лимфоциты с фенотипами CD3⁺CD25⁺ и CD3⁺HLA-DR⁺. Наличие изолированного абдоминального ожирения у мужчин сопровождалось повышением относительного содержания Т-лимфоцитов, относительного содержания клеток с фенотипом CD3⁺CD8⁺ и CD3⁺CD25⁺, а также абсолютного количества В-лимфоцитов. Сочетание абдоминального ожирения с артериальной гипертензией у мужчин характеризовалось снижением соотношения Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов за счет уменьшения относительного содержания CD3⁺CD4⁺ и повышения CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов. Количество Т-хелперов было достоверно ниже, чем в группе контроля и при изолированном абдоминальном ожирении. Количество Т-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺HLA-DR⁺ более чем в 2 раза превышало аналогичный показатель в группе практически здоровых мужчин.

Ключевые слова: метаболический синдром, субпопуляции лимфоцитов, абдоминальное ожирение, артериальная гипертензия

Адрес для переписки:

Сумеркина Вероника Андреевна
ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет» Министерства
здравоохранения РФ
454091, Россия, г. Челябинск, ул. 3-го Интернационала,
130, кв. 4.
Тел.: 8 (906) 866-33-50.
E-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Address for correspondence:

Sumerkina Veronika A.
South Ural State Medical University, Ministry of Healthcare
of the Russian Federation
454091, Russian Federation, Chelyabinsk, 3rd International str.,
130, apt 4.
Phone: 7 (906) 866-33-50.
E-mail: veronika.sumerkina@mail.ru

Образец цитирования:

В.А. Сумеркина, Л.Ф. Телешева, Е.С. Головнева,
С.В. Квятковская, Е.Е. Дворчик, «Субпопуляционный
состав лимфоцитов у молодых мужчин с метаболическим
синдромом» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2.
С. 187-192.

doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-187-192

© Сумеркина В.А. и соавт., 2016

For citation:

V.A. Sumerkina, L.F. Telesheva, E.S. Golovneva,
S.V. Kvyatkovskaya, E.E. Dvorchik, "Lymphocyte subpopulation
profile in young men with metabolic syndrome", *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 2, pp. 187-192.

doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-187-192

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-187-192>

LYMPHOCYTE SUBPOPULATION PROFILE IN YOUNG MEN WITH METABOLIC SYNDROME

Sumerkina V.A., Telesheva L.F., Golovneva E.S., Kvyatkovskaya S.V., Dvorchik E.E.

South Ural State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. Metabolic syndrome is a chronic subclinical inflammation. Published data on the immune state in metabolic syndrome are inconsistent, and, moreover, the gender features of metabolic syndrome are not described in details. The purpose of the study was to determine subpopulation profile of peripheral lymphocytes in young men with metabolic syndrome, as well as in cases of combined abdominal obesity and hypertension. The study included seventy-seven men aged 20-45 years. The men were divided into four groups matched by age: Group 1 represented healthy controls; group 2 included male patients with isolated abdominal obesity; group 3 consisted of males with a combination of abdominal obesity and hypertension; group 4, males with metabolic syndrome. The major lymphocyte subpopulations were isolated and analyzed by flow cytometry, i.e. T lymphocytes, T helpers, T-cytotoxic cells, TNK-lymphocytes, NK-cells, B-cells, as well as CD3⁺CD25⁺ and CD3⁺HLADR⁺ lymphocytes. In male patients with isolated abdominal obesity, we revealed increased relative contents of T lymphocytes, and increased proportion of the cells with CD3⁺CD8⁺, CD3⁺CD25⁺ phenotypes and higher B-cell numbers. A combination of abdominal obesity with hypertension in men was characterized by decreased ratio of T-helper/T-cytotoxic lymphocytes, due to reduced relative contents of CD3⁺CD4⁺ cells and increase in CD3⁺CD8⁺ lymphocytes. The numbers of T-helper cells in this group were significantly lower than in controls and among patients with isolated abdominal obesity. The number of T-cells with CD3⁺HLA-DR⁺ phenotype proved to be 2-fold higher than in the group of healthy male controls.

Keywords: lymphocyte subpopulations, abdominal obesity, hypertension

В настоящее время метаболический синдром (МС), наряду с артериальной гипертензией (АГ), атеросклерозом, сахарным диабетом 2 типа, признан одной из метаболических пандемий XXI века. Актуальность изучения патогенетических закономерностей формирования и прогрессирования МС обусловлена высокой частотой развития сердечно-сосудистых, эндокринных и других расстройств, а также потенциальной обратимостью возникших нарушений метаболизма. По мнению многих российских и зарубежных исследователей, метаболический синдром представляет собой субклинический хронический воспалительный процесс, ассоциированный с высокой склонностью пациентов к воспалительным заболеваниям различного генеза, которые зачастую приобретают хронический вялотекущий характер [2]. Литературные данные о состоянии иммунного статуса при МС неоднозначны, кроме того, гендерные особенности метаболического синдрома освещены недостаточно.

Цель исследования — определить особенности субпопуляционного состава лимфоцитов у молодых мужчин с МС и сочетанием абдоминального ожирения (АО) с артериальной гипертензией.

В исследование было включено 77 мужчин в возрасте 20-45 лет. Всем исследуемым лицам проводили измерение окружности талии, уровня артериального давления, определяли лабораторные показатели липидного и углеводного обмена. Метаболический синдром диагностировали в соответствии с Национальными рекомендациями Российского кардиологического общества (наличие у пациента абдоминального ожирения — окружность талии > 94 см в сочетании с любыми двумя дополнительными признаками — артериальное давление > 140/90 мм рт. ст.; уровень триглицеридов > 1,7 ммоль/л; уровень холестерина липопротеидов высокой плотности < 1,0 ммоль/л; уровень холестерина липопротеидов низкой плотности > 3,0 ммоль/л; уровень глюкозы натощак > 6,1 ммоль/л). Критерии исключения: сахарный диабет; венозный тромбоз на момент обследования или в анамнезе; онкологические заболевания на момент обследования либо в анамнезе; туберкулез; ВИЧ-инфекция; психические заболевания; острые и хронические воспалительные заболевания; прием гормональных препаратов.

Мужчины были распределены на 4 группы, сопоставимые по возрасту:

1 группа (n = 20) – контрольная группа (практически здоровые мужчины с окружностью талии ≤ 94 см и без дополнительных признаков метаболического синдрома);

2 группа (n = 17) – мужчины с изолированным абдоминальным ожирением;

3 группа (n = 17) – мужчины с сочетанием абдоминального ожирения и артериальной гипертензии;

4 группа (n = 23) – мужчины с метаболическим синдромом.

Материалом для исследования являлась венозная кровь, стабилизированная K_2 ЭДТА. Методом проточной цитометрии были выделены и проанализированы следующие субпопуляции лимфоцитов: Т-лимфоциты ($CD3^+CD45^+$), Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$), Т-цитотоксические ($CD3^+CD8^+$), ТНК-лимфоциты ($CD3^+CD56^+$), NK-лимфоциты ($CD3^-CD56^+$), В-лимфоциты ($CD3^-CD19^+$). Анализировали активированный пул клеток с фенотипами $CD3^+CD25^+$ и $CD3^+HLA-DR^+$. Окрашивание моноклональными антителами проводили в цельной крови. Для окрашивания были использованы четырехцветные реагенты линии IQTest: $CD45-FITC/CD56-RD1/CD19-ECD/CD3-PC5$, $CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD/CD3-PC5$, а также $HLA-DR-FITC$, $CD3-PC5$ и $CD25-PE$ производства фирмы Beckman Coulter, США. Исследование выполнено на лазерном проточном цитометре «Cytomics FC500» (Beckman Coulter, США) с использованием гетерогенного гейтирования.

Статистическую обработку результатов выполняли с помощью пакета прикладных программ STATISTICA 7,0 (StatSoft Inc., 2006, США). Для определения различия сравниваемых независимых выборок использовали непараметрические критерии Колмогорова–Смирнова, Вилкоксона–Манна–Уитни. Результаты представлены в виде медианы и интерквартильного размаха $Me (Q_{25}-Q_{75})$. Статистически достоверными считали значения $p < 0,05$.

Результаты иммунофенотипирования основных популяций лимфоцитов периферической крови представлены в таблице 1.

Наличие изолированного абдоминального ожирения у молодых мужчин сопровождалось повышением относительного содержания Т-лимфоцитов (81,9%) по сравнению с пациентами контрольной группы (74,1%) на фоне снижения их абсолютного числа. Среди популяции Т-лимфоцитов было обнаружено повышение относительного содержания клеток с фенотипом $CD3^+CD8^+$ (31,0% против 23,8% в контрольной группе), что послужило причиной снижения иммунорегуляторного индекса. Как относительное

(1,1%), так и абсолютное количество $CD3^+CD25^+$ клеток (22 кл/мкл) было достоверно ниже, чем в группе 1 (2,3%; 56 кл/мкл). Абсолютное число В-лимфоцитов у пациентов 2 группы было снижено (200 кл/мкл) по сравнению с практически здоровыми мужчинами (271 кл/мкл).

Сочетание абдоминального ожирения с артериальной гипертензией у мужчин характеризовалось снижением соотношения Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов по сравнению с практически здоровыми мужчинами (1,40 и 1,87 соответственно) за счет уменьшения относительного содержания $CD3^+CD4^+$ и повышения $CD3^+CD8^+$ лимфоцитов. Количество Т-хелперов (40,5%) было достоверно ниже, чем в группе контроля (45,9%) и группе 2 (43,9%). Количество Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+HLA-DR^+$ у пациентов группы 3 более чем в 2 раза превышало аналогичный показатель в группе контроля (группа 3 – 1,2%, 33 кл/мкл; группа 1 – 0,5%, 13 кл/мкл). По сравнению с группой мужчин с изолированным абдоминальным ожирением у пациентов с сочетанием АО и АГ наблюдалось достоверно более высокое содержание ТНК-лимфоцитов.

По мнению многих исследователей, развитие метаболического синдрома ассоциировано с дисфункцией как гуморального, так и клеточного звена иммунитета [1, 5, 7, 8, 11, 12]. Нарушения системы иммунитета при метаболическом синдроме обусловлены особенностями физиологии жировой ткани, клетки которой синтезируют и секретируют в системный кровоток адипокины. При избытке висцерального пула жировой ткани адипоциты продуцируют большое количество медиаторов воспаления. Согласно современным представлениям, центральным патогенетическим механизмом метаболического синдрома признают инсулинорезистентность, формированию которой способствует абдоминальное ожирение. Отмечена инфильтрация гипертрофированной жировой ткани макрофагами, причем степень инфильтрации коррелирует с индексом массы тела и средним размером адипоцитов; возрастает синтез адипоцитами цитокинов – интерлейкина 1β , интерлейкина 6, интерлейкина 8, моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 типа и фактора некроза опухоли α [4]. Вероятно, макрофагальная инфильтрация является одной из причин инсулинорезистентности [3, 5, 10]. Также активации клеточного звена иммунитета при метаболическом синдроме способствует синтез провоспалительных цитокинов жировой тканью, высокая экспрессия молекул межклеточной адгезии ICAM-1 и VCAM-1. Кроме того, патологические изменения углеводного и липид-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У МУЖЧИН С МС И АБДОМИНАЛЬНЫМ ОЖИРЕНИЕМ, Me (Q₂₅-Q₇₅)

Показатель	Группа 1 (контроль) n = 20	Группа 2 (АО) n = 17	Группа 3 (АО + АГ) n = 17	Группа 4 (МС) n = 23	p
Количество лимфоцитов, %	37,5 (31,3-45,7)	35,7 (35,4-37,1)	39,7 (35,6-42,5)	36,2 (34,2-39,4)	
Количество лимфоцитов, × 10 ⁹ / л	2,5 (2,2-2,9)	2,2 (2,2-2,3)	2,8 (2,4-3,4)	2,5 (2,2-3,2)	P _{2,3} < 0,05
CD3 ⁺ CD45 ⁺ , %	74,1 (71,5-77,1)	81,9 (79,7-83,5)	74,7 (68,9-80,3)	73,9 (70,6-76,8)	P _{1,2} < 0,05
CD3 ⁺ CD45 ⁺ , кл/мкл	1916 (1657-2085)	1712 (1651-1809)	2047 (1706-2153)	1816 (1677-2120)	P _{1,2} < 0,03
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	45,9 (42,3-47,2)	43,9 (43,8-46,1)	40,5 (37,9-41,7)	44,5 (40,7-51,6)	P _{1,3} < 0,005 P _{2,3} < 0,05 P _{2,4} < 0,05 P _{3,4} < 0,05
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , кл/мкл	1147 (998-1330)	936 (900-998)	1057 (946-1363)	1110 (941-1406)	
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	23,8 (18,7-28,2)	31,0 (27,5-34,8)	28,6 (24,9-29,5)	20,6 (17,8-27,4)	P _{1,2} < 0,05 P _{1,3} < 0,05 P _{2,4} < 0,05 P _{3,4} < 0,025
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , кл/мкл	595 (455-725)	671 (593-754)	791 (576-896)	496 (392-673)	P _{3,4} < 0,05
ИРИ	1,87 (1,51-2,73)	1,40 (1,32-1,52)	1,41 (1,38-1,72)	2,12 (1,57-2,90)	P _{1,2} < 0,05 P _{1,3} < 0,05 P _{3,4} < 0,05
CD3 ⁺ CD56 ⁺ , %	4,7 (1,7-8,0)	3,7 (2,5-6,0)	4,9 (2,7-8,4)	4,1 (2,8-6,1)	
CD3 ⁺ CD56 ⁺ , кл/мкл	113 (37-161)	60 (59-66)	140 (85-225)	104 (67-193)	P _{2,3} < 0,05 P _{2,4} < 0,05
CD3 ⁻ CD56 ⁺ , %	9,0 (5,3-11,3)	6,7 (5,1-6,8)	9,7 (7,2-14,6)	9,1 (5,6-15,3)	
CD3 ⁻ CD56 ⁺ , кл/мкл	239 (120-275)	157 (111-158)	228 (174-426)	208 (134-347)	
CD3 ⁻ CD19 ⁺ , %	10,8 (8,9-11,9)	9,5 (7,4-10,6)	10,1 (9,5-11,5)	11,4 (9,1-13,7)	
CD3 ⁻ CD19 ⁺ , кл/мкл	271 (248-316)	200 (178-221)	272 (218-313)	246 (201-455)	P _{1,2} < 0,025 P _{2,3} < 0,05
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , %	2,3 (1,3-3,0)	1,1 (1,0-1,3)	2,9 (1,9-5,3)	3,3 (2,2-4,2)	P _{1,2} < 0,05 P _{2,3} < 0,05 P _{2,4} < 0,025
CD3 ⁺ CD25 ⁺ , кл/мкл	56 (39-82)	22 (18-31)	84 (51-106)	73 (51-113)	P _{1,2} < 0,01 P _{2,3} < 0,05 P _{2,4} < 0,01
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , %	0,5 (0,3-0,8)	0,8 (0,7-0,9)	1,2 (1,0-1,4)	1,2 (0,4-2,0)	P _{1,3} < 0,005
CD3 ⁺ HLA-DR ⁺ , кл/мкл	13 (7-16)	15 (14-16)	33 (23-42)	26 (8-43)	P _{1,3} < 0,01

ного обмена при инсулинорезистентности могут инициировать нарушение иммунного статуса.

По данным литературы, абсолютное количество лимфоцитов у больных метаболическим синдромом превышает аналогичные показатели у здоровых лиц. Отмечено повышение содержания CD25⁺ лимфоцитов [1]. Известно, что молекула CD25 представляет собой α -цепь рецептора к IL-2. Рост содержания CD25-лимфоцитов при метаболическом синдроме может свидетельствовать о напряжении клеточного звена иммунитета. Содержание В-клеток у пациентов с МС повышено, что может быть обусловлено антигенной стимуляцией иммунной системы со стороны модифицированных липопротеидов. При метаболическом синдроме снижается количество Т-регуляторных клеток, которые выполняют иммуносупрессорную функцию [6].

В нашем исследовании у мужчин с изолированным АО отмечен рост относительного содержания Т-цитотоксических лимфоцитов и снижение числа лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD25⁺, что отражает недостаточную активацию лимфоцитов и снижение их способности к пролиферации и дифференцировке. В совокупности данные

изменения свидетельствуют об угнетении клеточного адаптивного иммунитета.

Сочетание АО и АГ у мужчин в молодом возрасте характеризуется дисбалансом Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов в сочетании с повышением содержания лимфоцитов с фенотипом CD3⁺HLA-DR⁺. Маркер HLA-DR отражает не только позднюю, но и длительную активацию лимфоцитов. По мнению некоторых исследователей, рост содержания лимфоцитов, несущих на своей поверхности HLA-DR, можно рассматривать в качестве маркера апоптоза Т-лимфоцитов. В целом отмеченные нами изменения свидетельствуют о напряжении клеточного иммунитета. По сравнению с группой мужчин с изолированным абдоминальным ожирением у пациентов с сочетанием АО и АГ наблюдается повышение TNK-лимфоцитов, что является патогномоничным признаком клеточно-опосредованной цитотоксичности.

Интересно отметить, что наличие у мужчин молодого возраста МС не приводит к значимым изменениям субпопуляционного состава лимфоцитов по сравнению с практически здоровыми лицами.

Список литературы / References

1. Литвинова Л.С., Кириенкова Е.В., Аксенова Н.Н., Газатова Н.Д., Затолокин П.А. Особенности клеточного иммунитета и цитокинового репертуара у пациентов с метаболическим синдромом // Бюллетень сибирской медицины, 2012. № 3. С. 53-57. [Litvinova L.S., Kiriienkova Ye.V., Aksyonova N.N., Gazatova N.D., Zatolokin P.A. Features of cellular immunity and cytokine repertoire in patients with metabolic syndrome. *Byulleten' sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2012, no. 3, pp. 53-57. (In Russ.)]
2. Невзорова В.А., Помогалова О.Г., Настрадаин О.В. Роль эндотелиальной дисфункции в прогрессировании метаболического синдрома от факторов риска до сосудистых катастроф // Тихоокеанский медицинский журнал, 2008. № 3. С. 69-74. [Nevzorova V.A., Pomogalova O.G., Nastradin O.V. The role of endothelial dysfunctions in progressing of the metabolic syndrome from risk factors to vascular disease. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2008, no. 3, pp. 69-74. (In Russ.)]
3. Cinti S. Transdifferentiation properties of adipocytes in the adipose organ. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009, Vol. 297, no. 5, pp. 977-986.
4. Gustafson B., Gogg S., Hedjazifar S., Jenndahl L., Hammarstedt A., Smith U. Inflammation and impaired adipogenesis in hypertrophic obesity in man. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, 2009, Vol. 297, no. 5, pp. 999-1003.
5. Kang H.S., Okamoto K., Takeda Y., Beak J.Y., Gerrish K., Bortner C.D., DeGraff L.M., Wada T., Xie W., Jetten A.M. Transcriptional profiling reveals a role for ROR α in regulating gene expression in obesity-associated inflammation and hepatic steatosis. *Physiol. Genomics*, 2011, Vol. 43, pp. 818-828.
6. Leibowitz A., Rehman A., Paradis P., Schiffrin E.L. Role of T regulatory lymphocytes in the pathogenesis of high-fructose diet-induced metabolic syndrome. *Hypertension*, 2013, Vol. 61, pp. 1316-1321.
7. Martín-Cordero L., García J.J., Hinchado M.D., Ortega E. The interleukin-6 and noradrenaline mediated inflammation-stress feedback mechanism is dysregulated in metabolic syndrome: effect of exercise. *Cardiovasc. Diabetol.*, 2011, Vol. 10, no. 12.
8. Picchi A., Gao X., Belmadani S., Potter B.J., Focardi M., Chilian W.M., Zhang C. Tumor necrosis factor- α induces endothelial dysfunction in the prediabetic metabolic syndrome. *Circ. Res.*, 2006, Vol. 99, pp. 69-77.
9. Sanada K., Iemitsu M., Murakami H., Tabata I., Yamamoto K., Gando Y., Suzuki K., Higuchi M., Miyachi M. PPAR γ 2 C1431T genotype increases metabolic syndrome risk in young men with low cardiorespiratory fitness. *Physiol. Genomics*, 2011, Vol. 43, pp. 103-109.

10. Suganami T., Nishida J., Ogawa Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes role of free fatty acids and tumor necrosis factor- α . *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, pp. 2062-2068.
11. Tesauro M., Schinzari F., Iantorno M., Rizza S., Melina D., Lauro D., Cardillo C. Ghrelin improves endothelial function in patients with metabolic syndrome. *Circulation*, 2005, Vol. 112, pp. 2986-2992.
12. Westcott D.J., Del Proposto J.B., Geletka L.M., Wang T., Singer K., Saltiel A.R., Lumeng C.N. MGL1 promotes adipose tissue inflammation and insulin resistance by regulating 7/4^{hi} monocytes in obesity. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 13, pp. 3143-3156.

Авторы:

Сумеркина В.А. — к.м.н., старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Телешева Л.Ф. — д.м.н., профессор, кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии и клинической лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Головнева Е.С. — д.м.н., профессор, кафедра нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Квятковская С.В. — к.м.н., научный сотрудник НИИ иммунологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Дворчик Е.Е. — к.м.н., научный сотрудник НИИ иммунологии ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Челябинск, Россия

Authors:

Sumerkina V.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Central Research Laboratory, South Ural State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

Telesheva L.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Microbiology, Virology, Immunology and Clinical Laboratory Diagnostics, South Ural State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

Golovneva E.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Normal Physiology, South Ural State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

Kvyatkovskaya S.V., PhD (Medicine), Research Associate, Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

Dvorchik E.E., PhD (Medicine), Research Associate, Institute of Immunology, South Ural State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 17.06.2015
Отправлена на доработку 30.06.2015
Принята к печати 01.07.2015

Received 17.06.2015
Revision received 30.06.2015
Accepted 01.07.2015

VII ВСЕРОССИЙСКАЯ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ШКОЛА-КОНФЕРЕНЦИЯ ПО КЛИНИЧЕСКОЙ ИММУНОЛОГИИ «ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ» 31 ЯНВАРЯ – 6 ФЕВРАЛЯ 2016 г.



VII Всероссийская с международным участием школа-конференция по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» прошла 31 января – 6 февраля 2016 года в заповеднике «Пушкинские Горы» Псковской области.

Как и в предыдущие годы, Школа проходила под эгидой Министерства здравоохранения Российской Федерации, Российской академии наук, Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека и Правительства Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе при поддержке Администрации Псковской области. Основными организаторами Школы выступили: ФГБУ «ГНЦ Институт иммунологии» ФМБА России, Санкт-Петербургский Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова, Российское научное общество иммунологов, Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов, Российское цитокиновое общество, Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация лабораторной медицины», Санкт-Петербургское региональное отделение Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов.

На торжественной церемонии открытия Школы от Российской академии наук и от Российского научного общества иммунологов с приветствием выступил академик РАН Владимир Александрович Козлов, от Правительства Псковской области – первый заместитель губернатора Вера Васильевна Емельянова и Председатель Комитета по здравоохранению и фармации Игорь Иванович Потапов, от Администрации Пушкиногорского района Псковской области – председатель администрации Николай Владимирович Иванов, от Российского цитокинового общества – профессор Андрей Семенович Симбирцев, от Федерации лабораторной медицины – президент ФЛМ, профессор Анатолий Глебович Кочетов и от Санкт-Петербургского регионального отделения Российской ассоциации аллергологов и клинических иммунологов – член-корреспондент РАН Арег Артемович Тотолян.

На Школе обсуждались самые актуальные вопросы клинической иммунологии. Академик РАН Козлов Владимир Александрович (Новосибирск) рассказал об основных заболеваниях человека с точки зрения иммунопатогенеза, член-корреспондент РАН Тотолян Арег Артемович (Санкт-Петербург) –

о возможностях иммунологической лабораторной диагностики, главный специалист по клинической лабораторной диагностике Минздрава РФ Кочетов Анатолий Глебович (Москва) — о стандартизации клинических лабораторных иммунологических исследований, а член-корреспондент Караулов Александр Викторович (Москва) — о системе мукозального иммунитета и о подходах к местной иммунокоррекции. В связи с бурным развитием иммунологии существенная часть лекций была посвящена вопросам фундаментальной иммунологии и цитокинам. В лекциях академика РАН Черешнева Валерия Александровича (Москва-Екатеринбург) обсуждались аспекты иммунологии воспаления; д.м.н. Топтыгиной Анны Павловны (Москва) — иммунного ответа в лимфатическом узле и механизмы развития толерантности; д.м.н. Семикиной Елены Леонидовны (Москва) — возрастные аспекты Т- и В-клеточной дифференцировки; профессора Балмасовой Ирины Петровны (Москва) — биологическая роль и клиническое значение лимфоцитов врожденного иммунного ответа; к.б.н. Ищенко Александра Митрофановича (Санкт-Петербург) — система комплемента; профессора Калининой Наталии Михайловны (Санкт-Петербург) — современные представления о механизмах презентации антигена; профессора Кокрякова Владимира Николаевича (Санкт-Петербург) — эффекторные механизмы врожденного иммунитета; член-корреспондента РАН Кетлинского Сергея Александровича (Санкт-Петербург) — TOLL-подобные рецепторы и цитокины; профессора Козлова Ивана Генриховича (Москва) — контактные взаимодействия в физиологии иммунного ответа; профессора Суворова Александра Николаевича (Санкт-Петербург) — значение микробиоты кишечника для здоровья человека; профессора Нестеровой Ирины Вадимовны (Москва) — нейтрофильные гранулоциты. Серия лекций была посвящена цитокинам: профессор Симбирцев Андрей Семенович (Санкт-Петербург) — интерфероны и интерлейкин-1; к.б.н. Ищенко Александр Митрофанович (Санкт-Петербург) — рецепторный антагонист интерлейкина-1; профессор Калинина Наталия Михайловна (Санкт-Петербург) — провоспалительные цитокины. В ряде лекций был представлен обзор терапевтических моноклональных антител (профессор Козлов Иван Генрихович, Москва), вопросы применения моноклональных антител в терапии заболеваний органов дыхания (профессор Шапорова Наталия Леонидовна, Санкт-Петербург), системной красной волчанки и иммуноопосредованных гломерулопатий (профессор Смирнов Алексей Владимирович, Санкт-Петербург), первичных иммунодефицитов (профессор Кондратенко Ирина Вадимовна, Москва). Два пленарных заседания, а также семинары компаний «Си Эс Эл Беринг» и «КЕДРИОН БиоФарма» были посвящены вопросам диагностики и терапии первичных иммунодефицитов и состояли из лекций профессоров Латышевой Татьяны Васильевны (Москва), Кондратенко Ирины Вадимовны (Москва), Продеуса Андрея Петровича (Москва), к.б.н. Белевцева Михаила Владимировича (Минск, Беларусь), к.м.н. Латышевой Елены Александровны (Москва) и к.м.н. Корсунского Ильи Анатольевича (Москва). Проблема иммунотерапии вторичных иммунодефицитов обсуждалась в рамках симпозиума компании «Петровакс Фарм» на тему «Иммунодефициты. Привилегия современного человека?» в лекциях профессоров Федосковой Татьяны Германовны (Москва) и Калининой Наталии Михайловны (Санкт-Петербург). Самостоятельное заседание, состоящее из лекций академиков РАН Черешнева Валерия Александровича (Москва-Екатеринбург) и Белякова Николая Алексеевича (Санкт-Петербург), профессора Степановой Елены Владимировны (Санкт-Петербург) и к.б.н. Семенова Александра Владимировича (Санкт-Петербург), было посвящено эволюции эпидемии ВИЧ-инфекции, вопросам терапии СПИДа и разработки вакцин против ВИЧ. Важное место в программе Школы было уделено деятельности иммунологических лабораторий. Тематическое пленарное заседание было посвящено аллергологии и состояло из лекций профессора Ханферьяна Романа Аваковича (Москва) об иммуноглобулине Е и об аллергенах для диагностики и терапии; профессора Федосковой Татьяны Германовны (Москва) об аллергических заболеваниях кожи и ЛОР-органов; к.м.н. Козловой Яны Игоревны (Санкт-Петербург) об иммунотерапии в лечении аллергических заболеваний. Некоторые частные вопросы клинической иммунологии были освещены в лекциях к.м.н. Чернышева Олега Борисовича (Санкт-Петербург) об иммунотерапии хирургического сепсиса и рожистого воспаления; д.м.н. Бабаченко Ирины Владимировны (Санкт-Петербург) о хронических герпесвирусных инфекциях; профессора Балмасовой Ирины Петровны (Москва) об иммунотропных эффектах антибиотиков; профессора Нестеровой Ирины Вадимовны (Москва) о применении интерферонов в клинической практике; профессора Сест Татьяны Павловны (Санкт-Петербург) об иммунопатогенезе саркоидоза и идиопатического фиброзирующего альвеолита. Лабораторным технологиям, которые применяются в работе иммунологических лабораторий были посвящены лекции профессора Раева Михаила Борисовича (Пермь), к.б.н. Дьячкова Ивана Сергеевича (Санкт-Петербург), Черняевой Елены Владимировны (Санкт-Петербург) и Аникаева Алексея Юрьевича (Москва). Возможностям проточной цитометрии и молекулярных технологий были посвящены симпозиум компании «Бекман Культер» «Компоненты врожденного и приобретенного иммунитета в механизмах регуляции», симпозиум компании «Merck

Life Science» «Трансляционная биомедицина: современные методы междисциплинарных исследований», мастер-классы по проточной цитометрии компании «Бекман Культер» (профессор Хайдуков Сергей Валерьевич, Москва; к.б.н. Савицкий Валерий Павлович, Москва; к.б.н. Остроумов Константин Борисович, Москва; к.б.н. Кудрявцев Игорь Владимирович, Санкт-Петербург) и мастер-класс компании «БиоЛайн» (к.б.н. Решетников Игорь Владимирович, Санкт-Петербург). Кроме того, состоялось рабочее совещание Комитета по иммунологическим методам Федерации лабораторной медицины на тему «Вопросы стандартизации лабораторных иммунологических исследований», на котором обсуждался проект «Клинические рекомендации по иммунологической лабораторной диагностике аутоиммунных заболеваний» авторов Лапина С.В., Булгаковой Т.В., Сурковой Е.А., Блиновой Т.В., Маслянского К.А., Эмануэля В.Л., Тотоляна А.А., и было принято решение обратиться в Федерацию лабораторной медицины с предложением организовать совместно с РНОИ открытое обсуждение данного проекта.

Необходимо отметить, что все лекции сопровождались очень активной дискуссией. Эти дискуссии не обошлись без острых столкновений мнений участников.

Школа вполне оправдала название Всероссийской с международным участием, т.к. в ее работе приняли участие 183 представителя из Латвии (Рига), Беларуси (Минск, Гомель), Киргизии (Бишкек), Абхазии (Сухум), а также из 24 регионов Российской Федерации: Архангельск, Брянск, Волгоград, Вологда, Екатеринбург, Ижевск, Иркутск, Калининград, Калужская область, Комсомольск-на-Амуре, Красноярск, Ленинградская область, Москва, Нижний Новгород, Новосибирск, Пермь, Псков, Санкт-Петербург, Сочи, Тюмень, Уфа, Хакасия, Челябинск, Ярославль.

Многие участники отмечали теплую, дружескую атмосферу Школы, на которой интересная лекционная программа сочеталась с не менее полезной культурной программой, включавшей экскурсии в Михайловское, Тригорское, Петровское, Дом Сергея Довлатова в Березино, Святогорский монастырь, Печорский монастырь и крепость Изборск. О доброжелательной и неформальной обстановке, царившей на Школе, может свидетельствовать и та добрая ирония, которая звучит в публикуемом нами шестом томе «Конспектов лекций», составленном участниками Школы: д.м.н. Семикиной Еленой Леонидовной и д.м.н. Топтыгиной Анной Павловной. На церемонии закрытия Школы прозвучало много слов благодарности, а также и обоснованные пожелания в адрес Оргкомитета, которые будут учтены при подготовке очередной Школы.

Оргкомитет считает своим приятным долгом от имени всех участников Школы выразить особую благодарность Администрации Псковской области и Пушкиногорского района, Комитету по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга, Генеральным спонсорам — компаниям «Бекман Культер» и «КЕДРИОН БиоФарма», Главным спонсорам — компаниям «БиоЛайн» и «Си Эс Эл Беринг», Стратегическому партнеру — компании «НПО Перовакс-Фарм», а также всем официальным спонсорам, финансовая поддержка которых сделала возможной организацию и проведение Школы.

Конспекты лекций, составленные участниками VII Всероссийской школы по клинической иммунологии «Иммунология для врачей» 31 января – 06 февраля 2016 г. Семикиной Е.Л. и Топтыгиной А.П.

В тот год осенняя погода

Стояла долго на дворе.

Зимы ждала, ждала природа —

Снег выпал только в январе.

А в феврале растаял снова...

Никто не ожидал такого,

Но почему-то млад и стар —

Все собрались на семинар.

Параграф первый ОРГМЕТОДОТДЕЛ

Игорь Иванович Потапов (руководитель здравоохранения Псковской области) бодро рапортует: «Мы зарождаем новые креативные мысли в ваших головах».

Михаил Борисович Раев обещает: «И в следующий раз (если будет следующий раз) нарисую все схемы».

Татьяна Германовна Федоскова уточняет: «Что, куда, сколько и зачем, а не то, что как пойдет».

Игорь Иванович Потапов уверен: «Те новации, которые обсуждаются как академические, постепенно приближаются к Псковской земле».

Но Владимир Александрович Козлов считает: «Пока медицина будет стоять в стороне от иммунологии, никаких пробивных технологий не будет».

Анатолий Глебович Кочетов радуется: «Судьба экспертов у нас довольно легкая. Надо подать документы, что ты великий, и сдать экзамен».

Владимир Александрович Козлов отмечает: «Есть какая-то целесообразность, но потом я скажу».

Михаил Борисович Раев предлагает: «Я просто мобилизую вашу память, и, может быть, удастся что-то обновить».

Алиса Юрьевна Медкова сообщает: «В представленном слайде можно разобраться, только если потратить часа 2».

Иван Генрихович Козлов утешает: «Я их постараюсь показать так, чтобы не вдаваться в подробности».

Иван Сергеевич Дьячков знает, «что важно для исследователя — публикабельные данные».

Анна Павловна Топтыгина предупреждает, что главное — чтобы не попала «протеосома — это машинка для уничтожения ненужных бумаг».

Александр Геннадиевич Борисов обобщает: «После таких обзорных лекций я приземляюсь и думаю, что нужно заниматься трансляционной медициной».

Андрей Петрович Продеус резюмирует: «Вот зачем нужно приезжать в Пушкинские Горы — чтобы тебе кто-нибудь что-нибудь сделал».

Михаил Борисович Раев замечает: «Такого нет, чтобы было регламентировано и было легче жить».

Илья Анатольевич Корсунский благодарит «за возможность послушать Ирину Вадимовну и ее похвалы».

Арег Артемович Тотолян объявляет: «У меня телефон загудел, а не зазвенел, к чему я и призываю всю аудиторию».

Татьяна Германовна Федоскова возражает: «Не мешайте мне заводить аудиторию!».

Тем не менее Анна Павловна Топтыгина настаивает: «Призываю докладчиков не выходить из берегов (так как ужин по расписанию)».

Александр Николаевич Суворов обещает: «Постараюсь не очень мучить вас рассказом о микроорганизмах до начала банкета».

Татьяна Германовна Федоскова провозглашает: «Народ ждет обед, а обед ждет народ».

Параграф второй КЛЕТКИ КАК ЛЮДИ

Наталья Михайловна Калинина обнаружил: «Субпопуляции... меняют экспрессию CD56 и становятся белыми и пушистыми и не обладают цитотоксическими свойствами».

Иван Генрихович Козлов наблюдает: «Некоторые клетки колобродят — заходят и уходят».

Михаил Борисович Раев добавляет: «И нуклеотиды, которые мельтешат рядом и ждут, когда температура понизится до 70 градусов».

Анна Павловна Топтыгина сгущает краски: «Тут барражируют макрофаги, которые всегда ищут, кого бы съесть».

Владимир Александрович Козлов сокрушается: «Макрофаг, нажравшийся иммунных комплексов, перестает защищать».

Александр Николаевич Суворов предлагает: «Мы можем ухватить бактерию за разные места».

Но Анна Павловна Топтыгина сомневается: «Они такие скользкие. Макрофагам их не поймать».

Однако Александр Николаевич Суворов не сдается: «Никто из бактерий не доплывал до середины Днепра».

И всё это потому, уверен Владимир Николаевич Кокряков, что «фагоцит является крематорием для микроорганизмов».

Иван Генрихович Козлов поднимает другую тему: «Лимфоцит в кровотоке как человек, который боится летать в самолете, его немножко тошнит».

А Козлов же, но Владимир Александрович, недоумевает: «Если он лимфоцит, то я тогда кто?».

Иван Генрихович режиссирует мизансцену: «Мы представляемся: я — фибробласт, я не пролиферирую, я синтезирую. Потом они взаимодействуют и заканчивается все смешно: фибробласт съедает лимфоцит».

Татьяна Павловна Сесь удивленно спрашивает: «Может, был какой-то иммунокомпромат у организма?».

А Наталья Михайловна Калинина точно знает: «CMV — гораздо более грустная инфекция».

Андрей Петрович Продеус не согласен: «Я бы не приписывал этому вирусу те свойства, которые приписывают родители в интернете».

Татьяна Германовна Федоскова уверена: «Вирусы свое черное дело делают. Клетки гибнут, затыкают бронхи».

А Валерий Александрович Черешнев подытоживает: «Вирусы говорят большое спасибо фармакотерапии».

Параграф третий ИММУНО-НАНО-БИО-ФАРМАКО-ТЕХНОЛОГИЯ

Иван Сергеевич Дьячков начинает с определения: «Мы — люди цифрового поколения».

Валерий Александрович Черешнев согласен, подумав, «какие-то там антитела титруют Беринг с Эрлихом у Коха».

Михаил Борисович Раев предполагает: «Кажется, счастье — в очень дорогих и изумительно производительных приборах».

Аникаев Алексей Юрьевич объясняет: «Компания приделала к этим стеклянным шприцам автоматизированную руку».

Иван Генрихович Козлов недоволен: «Оказалось, что она не работает, несмотря на то что активно вяжет».

А Владимир Николаевич Кокряков уточняет: «Это такой молекулярный перфоратор».

Владимир Александрович Козлов сокрушается: «У нас есть иммунологическая лаборатория в областной больнице. Но это же примитив! Зачем говорить о примитиве?».

Мария Сергеевна Селькова считает, что лаборатория полезна, потому что может сделать «неспецифический общий анализ крови».

Александр Владимирович Зурочка полагает, что из-за этого «... профессура вся ходит в очках, потому что сломали глаза, глядя в микроскоп».

Михаил Борисович Раев соглашается: «Сами знаете, какие методы удобны для использования, а какие даже процедурно вызывают отвращение», а дальше кается: «Про проточную цитометрию с моей стороны вообще, наверное, безнравственно говорить...».

Иван Генрихович Козлов точно знает: «Когда не получается тупо цитометрировать, они начинают хитро цитометрировать, а потом лезут внутрь клетки».

И в результате, по мнению Михаила Борисовича Раева, «... лазерный луч в своем покое стал нарушаться тем, что через него научились проводить клетки крови».

Иван Генрихович Козлов обращает внимание коллег: «В этом году особенно явно проявилось отсутствие молекулы».

С ним согласен Михаил Борисович Раев: «Всего одна молекула ДНК, которую просто так увидеть невозможно, а можно только предвидеть».

Зато Андрей Петрович Продеус радуется: «Знание этой мутации дало нам возможность не залечить пациента до смерти».

Параграф четвертый КЛИНИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Вступает Татьяна Германовна Федоскова: «Мы все говорим о персонифицированной, Господи, прости, терапии».

Андрей Петрович Продеус советует: «Если есть инфекция без температуры — сразу выписывайте направление к иммунологу».

С ним согласна Татьяна Германовна Федоскова: «Врач включает мозг, а не просто запихивает его в какую-то дырку».

Наталья Михайловна Калинина предостерегает: «Бездумное использование иммуномодуляторов должно быть очень осторожным».

И ее поддерживает Татьяна Германовна Федоскова: «Пациентам главное что-то разрешить».

Иван Генрихович Козлов анализирует: «Если Козлов разговаривает плохо, значит, организм болеет».

Андрей Петрович Продеус тут же ставит диагноз: «Он болеет чебедой».

Его поддерживает Татьяна Германовна Федоскова: «Это есть нельзя, лезя и все такое».

Андрей Петрович Продеус анализирует симптоматику: «То, что мы чувствуем — у буржуев называется голова болит», а также информирует: «36,6 — это название сети аптек, а не нормальная температура».

Татьяна Германовна Федоскова настаивает: «Очень важным моментом является профилактическая вакцинопрофилактика», потому что, по ее же мнению, «... это атопики: липнет к ним всё, а отлипает тяжело».

Валерий Александрович Черешнев предлагает радикальный способ лечения: «Только хлорка 20 мин убивает прион, но как же это ввести в организм?».

Но Татьяна Германовна Федоскова скептически замечает: «Ни один препарат в поле не воин».

Параграф пятый ЛЮДИ И ДРУГИЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ

Владимир Николаевич Кокряков заметил, что для опытов часто используют «млекопитающее как кролик или человек».

Елена Владимировна Черняева его поддерживает: «Кролик — это не только ценный мех, но и источник моноклональных антител».

Но мех тоже важен. Так, Анна Павловна Топтыгина, разглядывая мышей, замечает: «Некоторые считают, что они — голые. Но одетых мышей я ни разу не видела. Поэтому это лысые мыши».

Алиса Юрьевна Медкова считает, что именно «... обезьяны внесли большой вклад в благополучие человечества».

Параграф шестой УЖАСЫ НАШЕГО ГОРОДКА

Начал всех пугать Иван Генрихович Козлов: «Арег Артемович загнал нас в определенную ткань, ограниченную забором».

И, видимо, именно там, по мнению Татьяны Германовны Федосковой, «... люди привыкают дышать чем угодно, но не носом». А ведь «... человек не только дышит, он потом еще и ест».

Ирина Вадимовна Кондратенко предостерегает: «Иммунный ответ не должен быть бесконечен, а то же мы сами себя сожрем».

Валерий Александрович Черешнев рассказывает свою страшилку: «Эти племена скармливают мозг

умершего гражданина детям, печень — женщинам, а мужчинам — сердце, все распределено».

Но не всех удастся съесть, у Татьяны Германовны Федосковой есть «деревянные пациенты».

Ирина Вадимовна Кондратенко не отстаёт от коллеги: «Наш гомеостаз жив благодаря добровольной клеточной смерти».

Игорь Владимирович Кудрявцев мрачно констатирует: «Убивать способны не только цитотоксические клетки».

Татьяна Германовна Федоскова нагнетает: «Если пациент напоминает спелую сливу, его только ткни — пойдет сок».

От вопроса Валерия Александровича Черешнева просто мороз по коже: «Что же такое взорвалось в Кембрийский период 500 млн лет тому назад?».

Ответ знает Елена Леонидовна Семикина. Повидимому, образовался «иммунологический го-мункулус».

И Татьяна Германовна Федоскова закручивает почти гоголевский ужастик: «Уходит нос — приходит кожа».

Алексей Юрьевич Аникаев добавляет мрачных красок: «Компания Рош использует дозирующие головы».

И этот образ иммунологического Франкенштейна завершает Татьяна Германовна Федоскова, которая предлагает: «Если Вы сами не рискуете написать рекомендации, делайте это руками гастроэнтеролога».

Параграф седьмой ЦВЕТЫ ЖИЗНИ И ИХ РОДИТЕЛИ

Татьяна Германовна Федоскова даёт определение: «Дети — это лакмусовая бумажка любого региона».

Наталья Михайловна Калинина поддерживает: «Изменения у детишек могут происходить от здоровья матерей... и тогда мы этим женщинам настоятельно рекомендуем начинать заниматься репродуктивной функцией».

И Татьяна Германовна Федоскова с ней совершенно согласна: «Я всегда говорю родителям: беремеем вместе», потому что атопии, по мнению Татьяны Германовны Федосковой, «нужно доншивать и передавать по наследству».

Дети — странные существа, считает Илья Анатольевич Корсунский, ведь «... дети редко кормят грудью других детей».

А сердобольная Татьяна Германовна Федоскова замечает: «Малышей не хочется иногда мучить».

И Наталья Михайловна Калинина её поддерживает: «Больше всего люблю маленьким детям капать в нос и под язык».

Татьяна Германовна Федоскова уточняет: «Девочкам — свое, мальчикам — свое, но набор должен быть джентльменский».

Параграф восьмой ИМУНОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЛОСОФИЯ

Иван Сергеевич Дьячков беспокоится: «Вся наша гипотеза может превратиться в мусорное ведро».

Иван Генрихович Козлов с ним согласен: «Если это идеология, её сразу подхватывают стервятники».

При этом Иван Сергеевич Дьячков радуется, что «... большая часть глупых вопросов снимается».

Особенно, если знаешь, по мнению Михаила Борисовича Раева, «... то самое волшебное слово, которое необходимо понимать».

Иван Генрихович Козлов поддерживает: «Я захожусь в более оптимистической плоскости, чем в пессимистической».

Арег Артемович Топтыгин удовлетворенно замечает: «Многие вещи, начиная с природы, остались нетронутыми».

Валерий Александрович Черешнев задаётся вопросом: «Почему с опытом легко ориентироваться? Да потому что везде одно и то же».

Анна Павловна Топтыгина объясняет: «Эта толерантность ничего общего не имеет с общеевропейскими ценностями».

Валерий Александрович Черешнев восклицает: «Вот он гений русский, который везде себя проявит!».

Но Анна Павловна Топтыгина предупреждает: «В этой красоте прячется серьёзный подвох».

Валерий Александрович Черешнев предупреждает: «Если бы я говорил 30 лет назад, а я говорил».

С ним согласна Татьяна Павловна Сесь: «Вывод такой: ищем — поищем, найти пока не можем».

А Татьяна Германовна Федоскова сокрушается: «В погоне за причиной проходит вся жизнь».

Иван Сергеевич Дьячков дипломатично замечает: «Оставим это на краю беседы».

Иван Генрихович Козлов его поддерживает: «Самое удивительное — это удивление тех, кто об этом узнал».

Итог дискуссии подвёл Владимир Александрович Козлов:

«Изучайте иммунологию днем и ночью! Без этого — нельзя».

Законспектировали:

Семикина Елена Леонидовна: Москва, ФГБУ «Научный центр здоровья детей» Минздрава РФ, заведующая ЦКДЛ; РНИМУ им. Н.И. Пирогова, профессор кафедры факультетской педиатрии, д.м.н.

Топтыгина Анна Павловна: Москва, НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора, лаборатория цитокинов, ведущий научный сотрудник, д.м.н.

31 января — 06 февраля 2016 г., Псковская область, Пушкинские горы

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

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

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

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

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

Краткие сообщения

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

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

Обзорные статьи и лекции

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

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

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

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

Описание статьи из книги (монографии):

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

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

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

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

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

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

Обозначения, сокращения и единицы измерения

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

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

Оформление иллюстративного материала

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

Размеры иллюстраций:

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

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

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

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

Плата за публикацию статей

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

Подготовка статей

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

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
- 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).
 - Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
 - Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
 - Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.

- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx., rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

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

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абакушина Е.В.	151	Князев Д.И.	139	Руденко Л.Г.	129
Алиева А.И.	163	Коваленко Е.И.	151	Сахарнов Н.А.	139
Баженова Л.Г.	177	Козырева В.С.	171	Свитич О.А.	163
Бруснигина Н.Ф.	139	Кузьмина Е.Г.	151	Сорокина Л.Н.	183
Головнева Е.С.	187	Лосев И.В.	129	Сумеркина В.А.	187
Дворчик Е.Е.	187	Лукоянычева Е.Б.	119	Телешева Л.Ф.	187
Донина С.А.	129	Минеев В.Н.	183	Уткин О.В.	139
Ерофеева М.К.	129	Найхин А.Н.	129	Цветкова В.Д.	139
Зверев В.В.	163	Нёма М.А.	183	Чернявский А.М.	171
Зорин Н.А.	177	Неприна Г.С.	151	Шабалдин А.В.	119
Зорина В.Н.	177	Неумоина Н.В.	139	Шилова А.Н.	171
Зорина Р.М.	177	Омарова С.М.	163	Ширинский В.С.	107
Исакова О.В.	177	Павлов В.В.	151	Ширинский И.В.	107
Каневский Л.М.	151	Петухова Г.Д.	129	Шкода О.С.	171
Квятковская С.В.	187	Рассказова Н.Д.	163	Шмулевич С.А.	119
Клинкова А.В.	151	Ровда Ю.И.	119	Шнайдер М.А.	107

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

абдоминальное ожирение	187	микроРНК	108
альтернативный сплайсинг	140	моноклеарные клетки	129
альфа-2-макроглобулин	177	новорожденные	163
артериальная гипертензия	187	определение иммуногенности	129
ассоциированный с беременностью		периферическая кровь	129
альфа-2-гликопротеин	177	противомикробные пептиды	163
ацетилирование гистонов	108	проточная цитометрия	171
белок MICA	152	ПЦР в реальном времени	140
бронхиальная астма	183	ревматоидный артрит	108
вентилятор-ассоциированные		рецептор NKG2D	152
и внутриутробные пневмонии	163	сплайсированные варианты	140
вирус гриппа	129	субпопуляции лимфоцитов	187
врожденные пороки сердца	119	супернатанты	129
врожденный иммунитет	163	тимэктомия	119
генистеин	177	транскрипция	183
гуморальный	129	фенотип	108
злокачественные лимфомы	152	фибробластоподобные синовиальные клетки ...	108
иммунный ответ	129	цитокин	177
иммунный статус	171	цитокины	163
иммуноглобулин Е	183	цитотоксические лимфоциты	152
инфекционный мононуклеоз	140	CD31	119
ишемическая болезнь сердца	171	CD45RA	119
лимфопролиферативные заболевания	152	DR3/LARD	140
лимфоциты	183	Id2	183
менопаузальная гормональная терапия	177	sMICA	152
метаболический синдром	187	VEGF	177
метилирование ДНК	108		



Рисунок 1. Культура фибробластоподобных синовиальных клеток синовиальной оболочки больных РА

Примечание. Окраска по Романовскому–Гимзе. Объектив микрофотографии 100х.

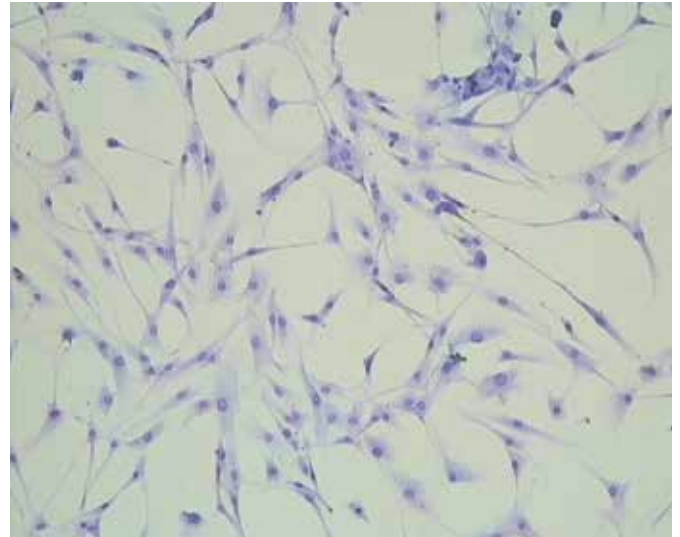


Рисунок 2. Культура фибробластоподобных синовиальных клеток синовиальной оболочки больных РА

Примечание. Окраска по Романовскому–Гимзе. Объектив микрофотографии 10х.

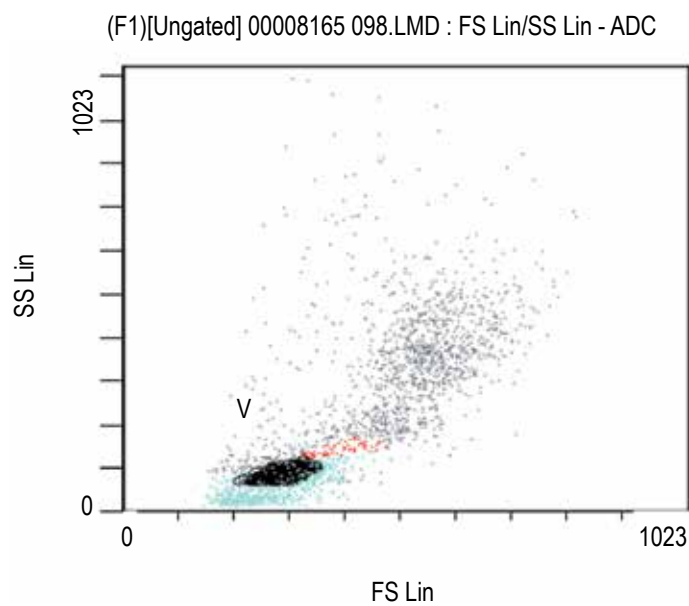


Рисунок 1. Гейтирование лимфоцитов по размеру клетки (FS) и внутриклеточной организации (SS)

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

