

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2016, том 18

№ 4

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

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

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

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, 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 04.08.2016 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 12. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1227

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 июня 2016 года журнал «Медицинская иммунология» включен в международную базу SCOPUS

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 Флуминенсе, Лаборатория биологии распознавания, Рио-де-Жанейро, Бразилия

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

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

July-August

2016, volume 18

No. 4

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, 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, Scientific 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 04.08.2016. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

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

Produced at the IPK Beresta Printing House.

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

Phone: (812) 388-90-00

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

Since June 2016 the Medical Immunology Journal is included into international SCOPUS 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

Лекция

Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р.

АДАПТИВНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С	309
---	-----

Обзоры

Казыгашева Е.В., Ширинский В.С., Ширинский И.В.

ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННЫЙ ОСТЕОАРТРИТ – СИНТРОПИЯ?	317
---	-----

Оригинальные статьи

Гаерилова М.В., Снегирева Н.А., Сидорова Е.В.

ВЛИЯНИЕ Breg И IL-10 НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ	331
--	-----

Путилин Д.А., Камышный А.М.

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ <i>Glut1</i> , <i>mTOR</i> И <i>AMPK1α</i> ЛИМФОЦИТАМИ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ	339
--	-----

Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р.

ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ИНТЕРФЕРОН-α-ИНДУЦИРОВАННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МОНОЦИТОВ В ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ	347
--	-----

Нероев В.В., Зайцева О.В., Балацкая Н.В., Курчаева З.В.

ЛОКАЛЬНАЯ И СИСТЕМНАЯ ПРОДУКЦИЯ VEGF-A ПРИ ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ	357
--	-----

Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л., Костюченко М.В., Куличенко А.Н.

ИНТЕНСИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ И ИММУННЫЙ СТАТУС У БОЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗОМ	365
--	-----

Краткие сообщения

Еремеева А.В., Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Лим В.В., Нёма М.А., Трофимов В.И.

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ FoxP3 ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ	373
--	-----

Савченко А.А., Каспаров Э.В., Арутюнян С.С., Борисов А.Г., Кудрявцев И.В., Мошев А.В.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И АДНЕКСИТОМ	379
---	-----

Иммунологические методы

Самойлович М.П., Грязева И.В., Мазинг А.В., Лапин С.В., Климович В.Б.

ИММУНОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА	385
---	-----

Правила для авторов	395
---------------------------	-----

Авторский указатель	398
---------------------------	-----

Предметный указатель	398
----------------------------	-----

CONTENTS

Lecture

Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Ostanin A.A., Starostina N.M., Chernykh E.R.

ADAPTIVE T-CELL RESPONSE IN PATHOGENESIS OF HEPATITIS C INFECTION	309
---	-----

Reviews

Kazygasheva E.V., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS: A SYNTROPY?	317
---	-----

Original articles

Gavrilova M.V., Snegireva N.A., Sidorova E.V.

INFLUENCE OF Breg AND IL-10 UPON HUMORAL IMMUNE RESPONSE	331
--	-----

Putilin D.A., Kamysnyi A.M.

CHANGES OF <i>Glut1</i> , <i>mTOR</i> AND <i>AMPK1α</i> GENE EXPRESSION IN PANCREATIC LYMPH NODE LYMPHOCYTES OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS	339
--	-----

Kurochkina Yu.D., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

EFFECT OF DEXAMETHASONE ON INTERFERON- α -INDUCED DIFFERENTIATION OF MONOCYTES TO DENDRITIC CELLS	347
--	-----

Neroev V.V., Zaytseva O.V., Balatskaya N.V., Kurchaeva Z.V.

LOCAL AND SYSTEMIC VEGF-A PRODUCTION IN COMPLICATED PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY	357
--	-----

Sarkisyan N.S., Ponomarenko D.G., Logvinenko V.O., Rakitina E.L., Kostyuchenko M.V., Kulichenko A.N.

INTENSITY OF SPECIFIC SENSITIZATION AND IMMUNE PROFILE IN PATIENTS WITH BRUCELLOSIS	365
---	-----

Short communications

Eremeeva A.V., Sorokina L.N., Mineev V.N., Lim V.V., Nyoma M.A., Trofimov V.I.

EXPRESSION OF FoxP3 TRANSCRIPTION FACTOR IN BRONCHIAL ASTHMA	373
--	-----

Savchenko A.A., Kasparov E.V., Arutyunyan S.S., Borisov A.G., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V.

PHENOTYPIC PROFILE OF B-LYMPHOCYTES IN WOMEN WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND ADNEXITIS	379
--	-----

Immunological methods

Samoylovich M.P., Griaeva I.V., Mazing A.V., Lapin S.V., Klimovich V.B.

IMMUNOMETRIC ASSAY TO DETERMINE FREE LIGHT CHAIN CONCENTRATIONS OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS	385
--	-----

Instructions to Authors	395
-------------------------------	-----

Author index	398
--------------------	-----

Subject index	398
---------------------	-----

АДАПТИВНЫЙ Т-КЛЕТОЧНЫЙ ОТВЕТ В ПАТОГЕНЕЗЕ ВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ, ОБУСЛОВЛЕННОЙ ВИРУСОМ ГЕПАТИТА С

Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Останин А.А., Старостина Н.М.,
Черных Е.Р.

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

Резюме. Вирусный гепатит С, будучи наиболее частой причиной поражения печени, представляет глобальную проблему, поскольку характеризуется широкой распространенностью, высокими показателями хронизации и значительно повышает риск возникновения цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы. Многочисленными исследованиями показано, что ключевую роль в патогенезе и исходе инфекции, обусловленной вирусом гепатита С, играют антиген-специфические $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-клетки. Развитие сильного устойчивого и мультиэпитопного Т-клеточного ответа приводит к элиминации вируса, тогда как несостоятельность адаптивного Т-клеточного ответа ассоциируется с персистенцией вируса. В настоящем обзоре приводятся данные о патогенетической значимости Т-клеточного ответа в элиминации вируса, вирусной персистенции и развитии гепатита, а также обсуждаются возможные механизмы несостоятельности Т-клеточного ответа при хронической инфекции.

Ключевые слова: антиген-специфический Т-клеточный ответ, $CD8^+$ Т-клетки, $CD4^+$ Т-клетки, вирусный гепатит С, адаптивный иммунный ответ, вирусные антигены

ADAPTIVE T-CELL RESPONSE IN PATHOGENESIS OF HEPATITIS C INFECTION

Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Ostanin A.A., Starostina N.M., Chernykh E.R.

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

Abstract. Chronic viral hepatitis C is the most common cause of liver damage and the global problem worldwide since is characterized by a high prevalence, high chronization rates, and significantly increases the risk of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Many studies have shown that antigen-specific $CD4^+$ and $CD8^+$ T-cells play a key role in pathogenesis and outcome of the infection. While the strong sustained antigen-specific multi-epitopic T-cell response predicts successful viral elimination, a deficiency of adaptive immune response is associated with virus persistence. This review presents data about pathogenetic significance of T-cell response in viral elimination, viral persistence and hepatitis development. Possible mechanisms of T-cell response failure in chronic infection are discussed as well.

Keywords: antigen-specific T-cell response, $CD8^+$ T-cells, $CD4^+$ T-cells, viral hepatitis C, adaptive T-cells response, viral antigens.

Адрес для переписки:

Олейник Екатерина Александровна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, Ядринцевская ул., 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: oleynik-90@bk.ru; ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Oleynik Ekaterina A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaia str., 14.
Phone: 7 (383) 228-21-01.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: oleynik-90@bk.ru; ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.А. Олейник, О.Ю. Леплина, А.А. Останин,
Н.М. Старостина, Е.Р. Черных «Адаптивный
Т-клеточный ответ в патогенезе вирусной инфекции,
обусловленной вирусом гепатита С» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 309–316.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-309-316

For citation:

E.A. Oleynik, O. Yu. Leplina, A.A. Ostanin, N.M. Starostina,
E.R. Chernykh "Adaptive T-cell response in pathogenesis
of hepatitis C infection", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 309–316.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-309-316

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-309-316>

© Олейник Е.А. и соавт., 2016

Введение

Вirus гепатита С (ВГС) вызывает острую инфекцию, которая в 55-85% случаев приводит к развитию хронического гепатита С (ХГС). В мире 130-160 миллионов человек, т.е. 2-3% всего населения, больны ХГС, из них ежегодно умирают 500 тысяч инфицированных. Персистенция вируса в течение 20-30 лет повышает риск развития цирроза печени до 15-45% и существенно увеличивает риск развития гепатоцеллюлярной карциномы и терминальных стадий печеночной недостаточности [40]. Учитывая эти факты, вирусный гепатит С признан глобальной проблемой здравоохранения.

В силу высокой генетической изменчивости вируса в мире до сих пор не существует эффективной профилактической вакцины против ВГС. В соответствии с международными рекомендациями лечение ВГС-инфекции включает препараты интерферона- α (в виде монотерапии или в сочетании с рибавирином). Однако такая терапия позволяет подавить репликацию вируса только у 40-50% пациентов с ВГС 1-го генотипа и часто вызывает развитие тяжелых осложнений, вынуждающих прекратить лечение [36, 61]. Обещающая стать прорывом в лечении ХГС таргетная терапия ингибиторами протеаз, которые участвуют в репликации вируса, также имеет ограничения, в частности, разработана для пациентов с ВГС 1-го генотипа и является исключительно дорогостоящей [60].

Элиминация ВГС осуществляется с участием реакций врожденного и приобретенного иммунитета. Врожденный иммунный ответ включает продукцию интерферонов I типа (IFN α и IFN β) и активацию НК-клеток; адаптивный — генерацию нейтрализующих антител и вирус-специфического Т-клеточного ответа. При этом главную роль в разрешении инфекции играют реакции Т-клеточного иммунитета, включающие индукцию выраженного, устойчивого полиэпитопного ответа CD4⁺Т-хелперных и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток [14, 27]. Именно с недостаточностью антиген-специфического Т-клеточного ответа связывают исход острой инфекции в хронизацию вирусной инфекции [39, 44].

Настоящий обзор посвящен роли Т-клеток в патогенезе ВГС-инфекции, а также возможным механизмам несостоятельности Т-клеточного ответа у пациентов с ХГС.

Биологические характеристики вируса гепатита С

Вirus гепатита С, обнаруженный в 1989 г., принадлежит к роду *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae* и представляет одноцепочечную РНК, содержащую около 9400-9600 нуклеотидных остатков. Геном ВГС не транспортируется в ядро клетки, репликация происходит в эндоплазматическом ретикулуме инфицированного гепатоцита [14].

Выделяют 6 основных генотипов вируса, которые отличаются нуклеотидной последовательностью на 30-35%, и подтипы в пределах одного генотипа, имеющие различия по 20-25% нуклеотидных остатков [3].

Кодируемый вирусом полипептид расщепляется вирусными и клеточными сигнальными протеазами на 3 структурных и 6 неструктурных белков. Структурные белки включают гликопротеины оболочки Е1 и Е2 и вирусный нуклеокапсидный белок Core. Неструктурные белки (NS2-NS5) обладают ферментативной активностью (NS2-цинк-зависимая протеаза; NS3-сериновая протеаза; хеликаза; нуклеотидтрифосфатаза; полипептид NS4a-кофактор для NS3 протеазы; NS5a-протеин, определяющий устойчивость клетки к интерферону; NS5b РНК-зависимая РНК-полимераза) и участвуют в процессах репликации вируса [41].

Все вирусные белки содержат эпитопы, распознаваемые В-клетками, хелперными (CD4⁺) и цитотоксическими (CD8⁺) Т-клетками. При этом одним из самых иммуногенных является Core-белок, содержащий большое количество консервативных эпитопов [11]. Острая ВГС-инфекция у большинства инфицированных людей протекает бессимптомно [14] и лишь в 15-30% случаев заканчивается выздоровлением. Вирусная РНК определяется в крови уже на 1-2 недели после заражения и достигает пика виремии (до 10⁷ копий/мл) через 6-10 недель [64]. При разрешении острой инфекции репликация вируса после достижения пика виремии быстро снижается. В то же время при персистенции острой инфекции виремия снижается только до определенного уровня (что свидетельствует о частичном контроле над инфекцией), после чего снова возрастает и сохраняется повышенной. Исход HCV-инфекции предопределяется в течение первых 6 месяцев после инфицирования.

Учитывая, что пик виремии приходится на 6-10 неделю, реакции врожденного иммунитета, которые развиваются в течение первых дней, не способны контролировать репликацию вируса [54]. В то же время пик виремии совпадает по времени с развитием реакций адаптивного Т-клеточного ответа [49], эффективность которого во многом определяет исход инфекции.

Адаптивный иммунный ответ против HCV-инфекции

Адаптивный иммунный ответ включает гуморальные и клеточные реакции. Несмотря на то, что вирусная инфекция индуцирует образование ВГС-нейтрализующих антител [5], гуморальный иммунный ответ не является решающим в элиминации вируса [33]. В то же время на сегодняшний день накоплено достаточное количество фактов, свидетельствующих о ключевой роли CD4⁺ и CD8⁺ вирус-специфических Т-клеток в детерминировании исхода ВГС инфекции.

Так, спонтанное выздоровление при острой ВГС-инфекции ассоциировано с выраженными и устойчивыми ответами CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, распознающих множественные вирусные эпитопы [27, 55], тогда как исход в хронизацию сопряжен со слабым преходящим ответом CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, характеризующихся узкой антигенной специфичностью [33, 52].

Роль CD4⁺Т-клеток в противовирусном ответе

Роль CD4⁺Т-клеток в противовирусной защите при ВГС-инфекции убедительно продемонстрирована в исследованиях на экспериментальных животных. Деплеция CD4⁺Т-клеток при повторном заражении шимпанзе (с разрешившейся инфекцией после первичного инфицирования) приводит к персистенции вируса из-за несостоятельности ответа CD8⁺Т-клеток. Это указывает на важную роль CD4⁺Т-клеток в генерации CD8⁺ цитотоксических Т-клеток и объясняет персистенцию ВГС-инфекции в отсутствие CD4⁺Т-хелперных клеток [20]. Значение CD4⁺Т-лимфоцитов подтверждается исследованиями у пациентов с острым ВГС, демонстрирующими, что полиэпитопный антиген-специфический ответ CD4⁺Т-клеток, регистрируемый при острой ВГС-инфекции, быстро исчезает после установления персистенции вируса [48]. Отсутствие или слабый ответ CD4⁺Т-клеток, проявляющийся снижением количества антиген-специфических CD4⁺Т-клеток, ингибацией их пролиферации и продукции Th1-цитокинов, характерен также для пациентов с хроническим гепатитом С (ХГС) [49].

С другой стороны, разрешение острой инфекции сопряжено с индукцией выраженного Th1- и Th17-ответа. Согласно современным представлениям, вирус-специфические CD4⁺Т-клетки не обладают прямым противовирусным эффектом, но способствуют генерации и усиливают эффекторную функцию антиген-специфических CD8⁺Т-клеток [57]. Одним из медиаторов, индуцирующих генерацию CD8⁺Т-клеток и их пролиферацию, является IL-2, вырабатываемый Th1-клетками [57]. Кроме того, большое значение в поддержании цитотоксического ответа отводится Th17-клеткам, продуцирующим IL-21. Разрешение острой инфекции сопряжено с возрастанием CD4⁺Т-клеток, продуцирующих IL-17 и IL-21, тогда как у пациентов с исходом в хронизацию наблюдается потеря IL-21 — продуцирующих CD4⁺Т-клеток. Это обусловлено тем, что дефицит IL-21 приводит к усилению экспрессии Т-клетками коингибиторных молекул (Tim-3, PD-1 and CTLA-4), проводящих сигналы апоптоза, что способствует деплеции Т-клеток. Кроме того, снижение IL-21 продуцирующих Т-клеток неизбежно приводит к экспансии регуляторных Т-клеток [24].

Роль CD8⁺Т-клеток в противовирусном ответе

Ведущая роль в элиминации ВГС отводится CD8⁺ цитотоксическим Т-клеткам (ЦТЛ). Вы-

раженная взаимосвязь между сильным полиэпитопным ответом CD8⁺Т-клеток и разрешением острой инфекции подтверждается данными нескольких исследований, продемонстрировавших сильную корреляцию между количеством вирус-специфических CD8⁺Т-клеток и элиминацией вируса [2, 20, 55]. Кроме того, имеется ряд других аргументов, свидетельствующих о значении вирус-специфических CD8⁺Т-клеток. Так, деплеция Т-клеток памяти у шимпанзе при повторном инфицировании животных ВГС приводит к персистирующей репликации вируса, несмотря на присутствие CD4⁺Т-клеток памяти [46]. С другой стороны, восстановление жизнеспособности и эффекторных функций CD8⁺Т-клеток на ранней стадии острой инфекции на фоне терапии пегилированным IFN α коррелирует с положительным вирусологическим ответом на данную терапию [4]. О роли CD8⁺Т-клеток свидетельствует также генетическая детерминированность к спонтанному выздоровлению, обусловленная экспрессией аллелей антигенов гистосовместимости I класса, связывающих иммунодоминантные ВГС-специфические эпитопы, распознаваемые CD8⁺Т-клетками [25, 37, 46].

Ввиду отсутствия моделей ВГС-инфекции на трансгенных мышах, механизмы противовирусной активности HCV-специфических CD8⁺Т-клеток до конца не ясны. Тем не менее предполагается, что действие CD8⁺Т-клеток может быть связано как с прямым цитолитическим эффектом на инфицированные гепатоциты, так и опосредоваться нецитолитическим путем через продукцию IFN γ . Прямой цитотоксический эффект Т-клеток реализуется с вовлечением перфорина, Fas/FasL- и TNF-опосредованных путей [14, 35]. Данный механизм цитотоксичности ЦТЛ напрямую связан с гибелью печеночных клеток и индукцией воспаления в паренхиме печени. На возможность нецитолитической элиминации вируса указывают результаты исследований, демонстрирующие, что эффективная элиминация вируса у шимпанзе может достигаться в отсутствие значительного поражения печени [55]. Также следует отметить, что у пациентов с разрешившейся острой ВГС-инфекцией ЦТЛ на ранних сроках характеризуются дефектной эффекторной функцией, которая восстанавливается на более поздней стадии острой инфекции [56]. В этот период ВГС-специфические CD8⁺Т-клетки начинают продуцировать IFN γ , что совпадает с быстрым снижением вирусной нагрузки. Непосредственное участие продуцируемого CD8⁺Т-клетками IFN γ в подавлении репликации ВГС подтверждено в культуральной модели *in vitro* [23].

Роль Т-клеток в развитии внутрипеченочного воспаления

Важно отметить, что, несмотря на важную роль CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток в элиминации вируса, Т-клеточный ответ является критическим

фактором, обуславливающим повреждение печени при ВГС-инфекции [52]. Поскольку ВГС является нецитопатическим для инфицированных клеток, иммунному ответу отводится ключевая роль в патогенезе печеночного воспаления. Действительно, повреждение клеток печени при остром ВГС совпадает по времени с пиком развития адаптивного иммунного ответа [15]. Иммуносупрессивная терапия сопровождается нормализацией повышенного уровня трансаминаз, а ее отмена — усилением активности ВГС [21]. Наличие гепатита при ВГС-инфекции ассоциировано с инфильтрацией печени эффекторными иммунными клетками [34].

Миграция Т-клеток в печень индуцируется хемокинами (CXCL10, CXCL9 и CCL5), которые продуцируются инфицированными гепатоцитами и взаимодействуют с рецепторами CCR5 и CXCR3 на поверхности Т-клеток [2, 30]. Снижение антиген-специфического ответа приводит к компенсаторному усилению продукции внутрипеченочных хемокинов, что сопровождается рекрутированием неспецифических CD8⁺Т-клеток и развитием воспалительной реакции в печени [50]. Продукция провоспалительных цитокинов Т-клетками, инфильтрирующими печень, инициирует хроническое воспаление и способствует развитию фиброза [17].

Механизмы неэффективности антиген-специфических CD8⁺Т-клеток при ВГС-инфекции

Несостоятельность антиген-специфического ответа CD8⁺Т-клеток наиболее характерна для хронической ВГС-инфекции с высокой репликацией вируса и проявляется ослаблением пролиферативной способности CD8⁺Т-клеток, снижением их цитотоксической активности, угнетением продукции IL-2 и IFN γ [19, 59], а также уменьшением количества и пролиферации CD8⁺Т-клеток памяти [51].

В настоящее время обсуждаются несколько возможных механизмов, обуславливающих дефектность антиген-специфического ответа CD8⁺Т-клеток. Нарушение функций ЦТЛ может быть связано с дефицитом CD4⁺Т-хелперных клеток, необходимых для генерации и экспансии CD8⁺Т-клеток [49]. Однако в большей степени несостоятельность ЦТЛ связывают с нарушениями в самих CD8⁺Т-клетках, индуцированными так называемыми внутренними и внешними механизмами. К первым относят повышенную экспрессию на Т-клетках ингибиторных молекул, проводящих сигналы апоптоза и анергии [32], ко вторым — подавление функций CD8⁺Т-клеток со стороны регуляторных Т-клеток и иммуносупрессивных цитокинов [38].

Исследования последних лет показали, что Т-клетки пациентов с ХГС характеризуются повышенной экспрессией ингибиторных молекул Bim [31], 2B4 [6], PD1 [6, 19], CTLA [42] и Tim-3 [70]. При этом блокирование *in vitro* молекул

PD-1 и CTLA-4 восстанавливает пролиферацию антиген-специфических CD8⁺Т-клеток и продукцию ими IFN γ и IL-2 [19, 42]. К аналогичному результату приводит блокирование Tim-3, и этот эффект усиливался при одновременном блокировании молекул Tim-3 и PD-1 [18]. Выявление молекулярных мишеней, опосредующих выключение функций ЦТЛ, представляет большой интерес в плане разработки новых стратегий восстановления иммунного ответа при ХГС, основанных на блокировании коингибиторных молекул. Однако следствием такого подхода может стать неконтролируемая Т-клеточная пролиферация, приводящая к развитию аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний. Ввиду этого требуются дополнительные исследования в этом направлении.

Супрессорные механизмы подавления функций ЦТЛ при хронической ВГС-инфекции опосредуются регуляторными Т-клетками и иммуносупрессивными цитокинами. Печень, будучи органом, в котором активно метаболизируются различные чужеродные антигены, характеризуется «толерогенным» микроокружением. Присутствующие в печени клетки Купфера конститутивно экспрессируют интерлейкин-10 (IL-10) и трансформирующий рост фактор- β (TGF- β), которые индуцируют состояние толерантности внутрипеченочных лимфоцитов [62]. В этом аспекте важно отметить, что IL-10 является предиктором хронизации ВГС-инфекции, и блокирование TGF- β приводит к увеличению продукции IFN γ антиген-специфическими CD8⁺Т-клетками больных с ХГС [1, 16]. Толерогенными свойствами, ассоциированными с незрелым фенотипом, обладают также локализованные в печени дендритные клетки [45]. Соответственно, в отличие от лимфоузлов, примирование наивных CD8⁺Т-клеток в печени приводит к генерации ЦТЛ с низкой жизнеспособностью и цитотоксической функцией [10].

У пациентов с ХГС в печени обнаружены IL10-продуцирующие CD8⁺Т-клетки, которые могут оказывать негативное влияние на антиген-специфические CD8⁺Т-клетки [34]. Кроме того, одним из главных источников IL-10 и TGF- β являются регуляторные CD4⁺Т-клетки (Treg), способные подавлять пролиферацию Т-клеток и их цитокин-продуцирующую функцию либо непосредственно, либо через иммуносупрессивные цитокины [59]. Исследования на приматах показали, что при первичном введении субинфекционной дозы ВГС индуцируется выраженный антиген-специфический ответ, а при повторном введении вируса отмечается экспансия Treg [43]. Treg обладают двойственной функцией при ХГС. С одной стороны, эти клетки защищают клетки печени от избыточного ответа CD8⁺Т-клеток, вызывающих внутрипеченочное воспаление. Так, у пациентов с нормальным уровнем транс-

аминаз и незначительным воспалением в печени регистрируется более высокое содержание Treg, чем у пациентов с выраженным цитолитическим синдромом [9]. С другой стороны, Treg причастны к несостоятельности CD8⁺T-клеток [38]. Дефектность CD8⁺T-клеток у пациентов с ХГС сопряжена с повышенным содержанием Treg в периферической крови и печени [22], и эти клетки *in vitro* ингибируют пролиферацию ВГС-специфических CD8⁺T-клеток и продукцию ими IFN γ [8].

Другой важной причиной дефекта ЦТЛ при ВГС-инфекции является прямое или опосредованное супрессивное действие вирусных антигенов. Например, взаимодействие Core белка с доменом рецептора gC1q на Т-клетках ингибирует активацию, пролиферацию и продукцию IL-2 Т-клетками [26], что приводит к подавлению генерации ЦТЛ и снижению их цитотоксической активности. Кроме того, подобно другим TLR2 лигандам, Core белок индуцирует генерацию и экспансию Treg, подавляющих пролиферацию и продукцию IFN γ Т-клетками [63].

Неполноценность ответа Т-клеток при ХГС может быть обусловлена иммуносупрессивным действием вирусных антигенов на дендритные клетки (ДК), которые являются профессиональными антиген-презентирующими клетками и активируют наивные CD4⁺ и CD8⁺T-клетки [46]. Так, структурные (Core, E1) и неструктурные (NS3) белки подавляют дифференцировку ДК, усиливают продукцию IL-10 и снижают продукцию IL-12 в культурах ДК; ингибируют способность ДК стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток; угнетают Th1- и усиливают Th2-стимулирующую активность ДК [13, 47, 58]. Указанные нарушения ДК снижают эффективность примирования Т-клеток [46].

Наконец, несостоятельность иммунного контроля со стороны CD8⁺T-клеток может быть связана с генетической изменчивостью вируса, что создает предпосылки для его ускользания от иммунного надзора. Генетическая изменчивость ВГС обусловлена высокой вариабельностью E1 и E2 белков вследствие частых замен аминокислотных остатков [29], а также появлением новых вариантов вируса (квазивидов) вследствие

отсутствия корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности NS5, что является причиной возникновения ошибок в процессе репликации РНК вируса [7]. У пациентов с ХГС вирусные мутации присутствуют в 50% всех эпитопов, распознаваемых ЦТЛ [28]. Причем появление мутаций характерно именно для развития хронической инфекции, в то время как у пациентов с исходом в выздоровление такие мутации отсутствуют [12, 53].

Заключение

В последние годы активное изучение роли антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺T-клеток при ВГС-инфекции позволило более глубоко осмыслить роль адаптивного иммунного ответа в элиминации ВГС и контроле за вирусной репликацией. Выяснилось, что CD4⁺T-клетки играют ключевую роль в индукции и поддержании вирус-специфических CD8⁺T-клеток, которые обеспечивают элиминацию вируса посредством цитолитических и нецитолитических механизмов. При этом исход в хронизацию ассоциирован с нарушениями адаптивного Т-клеточного ответа. Характерная для хронического течения ВГС-инфекции несостоятельность антиген-специфического ответа CD8⁺T-клеток обусловлена различными причинами — недостатком ответа CD4⁺T-хелперных клеток, истощением CD8⁺T-клеток вследствие их/анергии или апоптоза, супрессией ЦТЛ со стороны иммуносупрессивных цитокинов и регуляторных Т-клеток. Дисфункции антиген-специфических Т-клеток приводят к длительной персистенции вируса, что дает возможность вирусу создать генетически гетерогенную популяцию, позволяющую ему в дальнейшем легко уходить от иммунного контроля. Дальнейшие исследования взаимодействия вирусных белков с клетками иммунной системы и механизмов нарушения антиген-специфического Т-клеточного ответа позволят разработать новые иммунотерапевтические подходы, основанные на индукции эффективного устойчивого антиген-специфического Т-клеточного ответа.

Список литературы / References

1. Alatrakchi N., Graham C.S., van der Vliet H.J., Sherman K.E., Exley M.A., Koziel M.J. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD81 cells produce transforming growth factor beta that can suppress HCV-specific T-cell responses. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, no. 11, pp. 5882-5892.
2. Apolinario A., Majano P.L., Lorente R., Núñez O., Clemente G., García-Monzón C. Gene expression profile of T-cell-specific chemokines in human hepatocyte-derived cells: evidence for a synergistic inducer effect of cytokines and hepatitis C virus proteins. *J. Viral Hepat.*, 2005, Vol. 12, no. 1, pp. 27-37.
3. Bartenschlager R., Penin F., Lohmann V., André P. Assembly of infectious hepatitis C virus particles. *Trends in Microbiology*, 2011, Vol. 19, no. 2, pp. 95-103.
4. Badr G., Bédard N., Abdel-Hakeem M.S., Trautmann L., Willems B., Villeneuve J.P., Haddad E.K., Sékaly R.P., Bruneau J., Shoukry N.H. Early interferon therapy for hepatitis C virus infection rescues polyfunctional, long-lived CD8⁺ memory T cells. *J. Virol.*, 2008, Vol. 82, no. 20, pp. 10017-10031.

5. Beaumont E., Roch E., Chopin L., Roingeard P. Hepatitis C Virus E1 and E2 Proteins Used as Separate Immunogens Induce Neutralizing Antibodies with Additive Properties. *PLoS One.*, 2016, Vol. 11, no. 3, e0151626.
6. Bengsch B., Seigel B., Ruhl M., Timm J., Kuntz M., Blum H.E., Pircher H., Thimme R. Coexpression of PD-1, 2B4, CD160 and KLRG1 on exhausted HCV-specific CD81 T cells is linked to antigen recognition and T cell differentiation. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 6, e1000947.
7. Behrens S., Tomei L., Francesco R. Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J.*, 1996, Vol. 15, no. 1, pp. 12-22.
8. Boettler T., Spangenberg H.C., Neumann-Haefelin C., Panther E., Urbani S., Ferrari C., Blum H.E., von Weizsäcker F., Thimme R. T cells with a CD4⁺CD25⁺ regulatory phenotype suppress *in vitro* proliferation of virus-specific CD8⁺ T cells during chronic hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, 2005, Vol. 79, no. 12, pp. 7860-7786.
9. Bolacchi F., Sinistro A., Ciaprin C., Demin F., Capozzi M., Carducci F.C., Drapeau C.M.J., Rocchi G., Bergamini Increased A. Hepatitis C virus (HCV)-specific CD41CD251 regulatory T lymphocytes and reduced HCV-specific CD41 T cell response in HCV-infected patients with normal versus abnormal alanine aminotransferase levels. *Clin. Exp. Immunol.*, 2006, Vol. 144, no. 2, pp. 188-196.
10. Bowen D.G., Zen M., Holz L., Davis T., Geoffrey W. McCaughan, Bertolino P. The site of primary T cell activation is a determinant of the balance between intrahepatic tolerance and immunity. *J. Clin. Invest.*, 2004, Vol. 114, no. 5, pp. 701-712.
11. Bukh J., Miller R.H., Purcell R.H. Sequence analysis of the core gene of 14 hepatitis C virus genotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.*, 1994, Vol. 91, no. 17, pp. 8239-8243.
12. Cox A.L., Mosbruger T., Lauer G.M., Pardoll D., Thomas D.L., Ray S.C. Comprehensive analyses of CD8⁺ T cell responses during longitudinal study of acute human hepatitis C. *Hepatology*, 2005, Vol. 42, no. 1, pp. 104-112.
13. Dolganiuc A., Oak S., Kodys K., Golenbock D.T., Finberg R.W., Kurt-Jones E., Szabo G. Hepatitis C core and nonstructural 3 proteins trigger toll-like receptor 2-mediated pathways and inflammatory activation. *Gastroenterology*, 2004, Vol. 127, no. 5, pp. 1513-1524.
14. Dustin L.B., Rice C.M. Flying under the radar: the immunobiology of hepatitis C. *Annu Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 25, pp. 71-99.
15. Farci P., Alter H.J., Shimoda A., Govindarajan S., Cheung L.C., Melpolder J.C., Sacher R.A., Shih J.W., Purcell R.H. Hepatitis C virus-associated fulminant hepatic failure. *N. Engl. J. Med.*, 1996, Vol. 335, no. 9, pp. 631-634.
16. Flynn J.K., Dore G.J., Hellard M., Yeung B., Rawlinson W.D., White P.A., Kaldor J.M., Lloyd A.R., Ffrench R.A., ATAC Study Group. Early IL-10 predominant responses are associated with progression to chronic hepatitis C virus infection in injecting drug users. *J. Viral Hepat.*, 2010, Vol. 18, no. 8, pp. 549-561.
17. Friedman S.L. Liver fibrosis – from bench to bedside. *J. Hepatol.*, 2003, Vol. 38, Suppl. 1, pp. 38-53.
18. Golden-Mason L., Palmer B.E., Kassam N., Townshend-Bulson L., Livingston S., McMahon B.J., Castelblanco N., Kuchroo V., Gretch D.R., Rosen H.R. Negative immune regulator Tim-3 is overexpressed on T cells in hepatitis C virus infection and its blockade rescues dysfunctional CD41 and CD81 T cells. *J. Virol.*, 2009, Vol. 83, no. 18, pp. 9122-9130.
19. Golden-Mason L., Palmer B., Klarquist J., Mengshol J.A., Castelblanco N., Rosen H.R. Upregulation of PD-1 expression on circulating and intrahepatic hepatitis C virus-specific CD8⁺ T cells associated with reversible immune dysfunction. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, no. 17, pp. 9249-9258.
20. Grakoui A., Shoukry N.H., Woollard D.J., Han J.H., Hanson H.L., Ghayeb J., Murthy K.K., Rice C.M., Walker C.M. HCV persistence and immune evasion in the absence of memory T cell help. *Science*, 2003, Vol. 302, no. 5645, pp. 659-662.
21. Gruber A., Lundberg L.G., Bjorkholm M. Reactivation of chronic hepatitis C after withdrawal of immunosuppressive therapy. *J. Intern. Med.*, 1993, Vol. 234, no. 2, pp. 223-225.
22. Hashempoor T., Bamdad T., Merat S., Janzamin E., Nemati L., Jabbari H., Sharifi A.H., Zamini H. Expansion of CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ regulatory T cells in chronic hepatitis C virus infection. *Iran J. Immunol.*, 2010, Vol. 7, no. 3, pp. 177-185.
23. Jo J., Aichele U., Kersting N., Klein R., Aichele P., Bisse E., Sewell A.K., Blum H.E., Bartenschlager R., Lohmann V., Thimme R. Analysis of CD8⁺ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 136, no. 4, pp. 1391-1401.
24. Kared H., Fabre T., Bedard N., Bruneau J., Shoukry N.H. Galectin-9 and IL-21 mediate cross-regulation between Th17 and Treg cells during acute hepatitis C. *PLoS Pathog.*, 2013, Vol. 9, e1003422.
25. Kim A.Y., Kuntzen T., Timm J., Nolan B.E., Baca M.A., Reyor L.L., Berical A.C., Feller A.J., Johnson K.L., Schulze zur Wiesch J., Robbins G.K., Chung R.T., Walker B.D., Carrington M., Allen T.M., Lauer G.M. Spontaneous control of HCV is associated with expression of HLA-B*57 and preservation of targeted epitopes. *Gastroenterology*, 2011, Vol. 140, no. 2, pp. 686-696.
26. Kittlesen D.J., Chianese-Bullock K.A., Yao Z.Q., Braciale T.J., Hahn Y.S. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J. Clin. Invest.*, 2000, Vol. 106, no. 10, pp. 1239-1249.
27. Klenerman P., Thimme R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut.*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1226-1234.
28. Komatsu H., Lauer G., Pybus O.G., Ouchi K., Wong D., Ward S., Walker B., Klenerman P. Do antiviral CD8⁺ T cells select hepatitis C virus escape mutants? Analysis in diverse epitopes targeted by human intrahepatic CD8⁺ T lymphocytes. *J. Viral Hepat.*, 2006, Vol. 13, no. 2, pp. 121-130.

29. Kuiken C., Mizokami M., Deleage G., Yusim K., Penin F., Shin-I T., Charavay C., Tao N., Crisan D., Grando D., Dalwani A., Geourjon C., Agrawal A., Combet C. Hepatitis C databases, principles and utility to researchers. *Hepatology*, 2006, Vol. 43, no. 5, pp. 1157-1165.
30. Larrubia J.R., Calvino M., Benito S., Sanz-de-Villalobos E., Perna C., Pérez-Hornedo J., González-Mateos F., García-Garzón S., Bienvenido A., Parra T. The role of CCR5/CXCR3 expressing CD8⁺ cells in liver damage and viral control during persistent hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.*, 2007, Vol. 47, no. 5, pp. 632-641.
31. Larrubia J.R., Lokhande M.U., García-Garzón S., Miquel J., González-Praetorius A., Parra-Cid T., Sanz-de-Villalobos E. Persistent hepatitis C virus (HCV) infection impairs HCV-specific cytotoxic T cell reactivity through Mcl-1/Bim imbalance due to CD127 down-regulation. *J. Viral Hepat.*, 2013, Vol. 20, no. 2, pp. 85-94.
32. Larrubia J.R., Lokhande M.U., García-Garzón S., Miquel J., Subirá D., Sanz-de-Villalobos E. Role of T cell death in maintaining immune tolerance during persistent viral hepatitis. *World J. Gastroenterol.*, 2013, Vol. 19, no. 12, pp. 1877-1889.
33. Lechner F., Wong D.K., Dunbar P.R., Chapman R., Chung R.T., Dohrenwend P., Robbins G., Phillips R., Klennerman P., Walker B.D. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 9, pp. 1499-1512.
34. Liaw Y.F., Lee C.S., Tsai S.L., Liaw B.W., Chen T.C., Sheen I.S., Chu C.M. T-cell-mediated autologous hepatocytotoxicity in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 1995, Vol. 22, no. 5, pp. 1368-1373.
35. Liu S., Yang W., Shen L., Turner J.R., Coyne CB., Wang T. Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.*, 2009, Vol. 83, no. 4, pp. 2011-2014.
36. Manns M.P., Wedemeyer H., Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, sideeffects, and complications. *Gut*, 2006, Vol. 55, no. 9, pp. 1350-1359.
37. McKiernan S.M., Hagan R., Curry M., McDonald G.S., Kelly A., Nolan N., Walsh A., Hegarty J., Lawlor E., Kelleher D. Distinct MHC class I and II alleles are associated with hepatitis C viral clearance, originating from a single source. *Hepatology*, 2004, Vol. 40, no. 1, pp. 108-114.
38. Miroux C., Vausselin T., Delhem N.. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2010, Vol. 10, no. 11, pp. 1563-1572.
39. Missale G., Bertoni R., Lamonaca V., Valli A., Massari M., Mori C., Rumi M.G., Houghton M., Fiaccadori F., Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J. Clin. Invest.*, 1996, Vol. 98, no. 3, pp. 706-714.
40. Mohd Hanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of agespecific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 2013, Vol. 57, no. 4, pp. 1333-1334.
41. Moradpour D., Penin F., Rice C.M. Replication of hepatitis C virus. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2007, Vol. 5, no. 6, pp. 453-463.
42. Nakamoto N., Cho H., Shaked A., Olthoff K., Valiga M.E., Kaminski M., Gostick E., Price D.A., Freeman G.J., Wherry E.J., Kyong-Mi Chang. Synergistic Reversal of Intrahepatic HCV-Specific CD8 T Cell Exhaustion by Combined PD-1/CTLA-4 Blockade. *PLoS Pathog.*, 2009, Vol. 5, no. 2, e1000313.
43. Park S.-H., Veerapu N.S., Shin E.-C., Biancotto A., McCoy J.P., Capone S., Rehmann A.F.B. Sub infectious hepatitis C virus exposures suppress T cell responses against subsequent acute infection. *Nat. Med.*, 2013, Vol. 19, no. 12, pp. 1638-1642.
44. Penna A., Missale G., Lamonaca V., Pilli M., Mori C., Zanelli P., Cavalli A., Elia G., Ferrari C. Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology*, 2002, Vol. 35, no. 5, pp. 1225-1236.
45. Pillarisetty V.G., Shah A.B., Miller G., Bleier J.I., DeMatteo R.P. Liver dendritic cells are less immunogenic than spleen dendritic cells because of differences in subtype composition. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 2, pp. 1009-1017.
46. Rosen H.R. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 10, pp. 4121-4130.
47. Sarobe P., Lasarte J.J., Casares N., López-Díaz de Cerio A., Baixeras E., Labarga P., García N., Borrás-Cuesta F., Prieto J. Abnormal priming of CD4⁺ T cells by dendritic cells expressing hepatitis C virus core and E1 proteins. *J. Virol.*, 2002, Vol. 76, no. 10, pp. 5062-5070.
48. Schulze Zur Wiesch J., Ciuffreda D., Lewis-Ximenez L., Kasprowicz V., Nolan B.E., Streeck H., Aneja J., Reyor L.L., Allen T.M., Lohse A.W., McGovern B., Chung R.T., Kwok W.W., Kim A.Y., Lauer G.M. Broadly directed virus-specific CD4⁺ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J. Exp. Med.*, 2012, Vol. 209, no. 1, pp. 61-75.
49. Semmo N., Day C.L., Ward S.M., Lucas M., Harcourt G., Loughry A., Klennerman P. Preferential loss of IL-2-secreting CD41 T helper cells in chronic HCV infection. *Hepatology*, 2005, Vol. 41, no. 5, pp. 1019-1028.
50. Spirengers D., van der Molen R.G., Kusters J.G., Kwekkeboom J., van der Laan L.J., Niesters H.G., Kuipers E.J., De Man R.A., Schalm S.W., Janssen H.L. Flow cytometry of fine-needle-aspiration biopsies: a new method to monitor the intrahepatic immunological environment in chronic viral hepatitis. *J. Viral Hepat.*, 2005, Vol. 12, no. 5, pp. 507-512.

51. Stelekati E., Shin H., Doering T.A., Dolfi D.V., Ziegler C.G., Beiting D.P., Dawson L., Liboon J., Wolski D., Ali M.A., Katsikis P.D., Shen H., Roos D.S., Haining W.N., Lauer G.M., Wherry E.J. Bystander chronic infection negatively impacts development of CD8(+) T cell memory. *Immunity*, 2014, Vol. 40, no. 5, pp. 801-813.
52. Takaki A., Wiese M., Maertens G., Depla E., Seifert U., Liebetrau A., Miller J.L., Manns M.P., Rehmann B. Cellular immune responses persist and humoral responses decrease two decades after recovery from a single-source outbreak of hepatitis C. *Nat. Med.*, 2000, Vol. 6, no. 5, pp. 578-582.
53. Tester I., Smyk-Pearson S., Wang P., Wertheimer A., Yao E., Lewinsohn D.M., Tavis J.E., Rosen H.R. Immune evasion versus recovery after acute hepatitis C virus infection from a shared source. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, no. 11, pp. 1725-1731.
54. Thimme R., Binder M., Bartenschlager R. Failure of innate and adaptive immune responses in controlling hepatitis C virus infection. *FEMS Microbiol. Rev.*, 2012, Vol. 36, no. 3, pp. 663-683.
55. Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Wieland S., Pemberton J., Steiger C., Govindarajan S., Purcell R.H., Chisari F.V. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2002, Vol. 99, no. 24, pp. 15661-15668.
56. Thimme R., Oldach D., Chang K.M., Steiger C., Ray S.C., Chisari F.V. Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 10, pp. 1395-1406.
57. Urbani S., Amadei B., Fiscaro P., Tola D., Orlandini A., Sacchelli L., Mori C., Missale G., Ferrari C. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology*, 2006, Vol. 44, no. 1, pp. 126-139.
58. Waggoner S.N., Hall C.H., Hahn Y.S. HCV core protein interaction with gC1q receptor inhibits Th1 differentiation of CD4⁺ T cells via suppression of dendritic cell IL-12 production. *J. Leukoc. Biol.*, 2007, Vol. 82, no. 6, pp. 1407-1419.
59. Wedemeyer H., He X.S., Nascimbeni M., Davis A.R., Greenberg H.B., Hoofnagle J.H., Liang T.J., Alter H., Rehmann B. Impaired effector function of hepatitis C virus specific CD8⁺ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 6, pp. 3447-3458.
60. Wilby K.J., Partovi N., Ford J.A., Greanya E., Yoshida E.M. Review of boceprevir and telaprevir for the treatment of chronic hepatitis C. *Can. J. Gastroenterol.*, 2012, Vol. 26, no. 4, pp. 205-210.
61. World Health Organization. Hepatitis C: Fact sheet NO164. 2015. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs164/en/>.
62. You Q., Cheng L., Kedl R.M., Ju C. Mechanism of T cell tolerance induction by murine hepatic Kupffer cells. *Hepatology*, 2008, Vol. 48, no. 3, pp. 978-990.
63. Zhai N., Chi X., Li T., Song H., Li H., Jin X., Crispel N., Su L., Niu J., Tu Z. Hepatitis C virus core protein triggers expansion and activation of CD4(+) CD25(+) regulatory T cells in chronic hepatitis C patients. *Cell Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 12, no. 6, pp. 743-749.
64. Zoulim F., Chevallier M., Maynard M., Trepo C. Clinical consequences of hepatitis C virus infection. *Rev. Med. Virol.*, 2003, Vol. 13, no. 1, pp. 57-68.

Авторы:

Олейник Е.А. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

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

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

Authors:

Oleynik E.A., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

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

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

Поступила 16.06.2016
Принята к печати 20.06.2016

Received 16.06.2016
Accepted 20.06.2016

ДИАБЕТ-АССОЦИИРОВАННЫЙ ОСТЕОАРТРИТ – СИНТРОПИЯ?

Казыгашева Е.В., Ширинский В.С., Ширинский И.В.

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

Резюме. В обзоре данных литературы и материалах собственных исследований анализируются ряд предрасполагающих и патогенетических факторов в развитии распространенной коморбидной патологии – диабет-ассоциированного остеоартрита (ДАОА). Поскольку у исследователей и клиницистов пока не сложилось четкого представления о ДАОА как отдельном клиническом варианте ОА, авторам не удалось найти в литературе работ, посвященных изучению роли генетических факторов в развитии именно этого варианта болезни. Особое внимание обращено на исследования, посвященные поиску перекрестных генов – кандидатов риска развития как СД 2 типа, так и ОА: PPAR γ , FTO, ADIPOQ, RAGE, которые экспрессируют белки, потенциально способные участвовать в патогенезе как ОА, так и СД. Немногочисленные данные оказались противоречивы: в некоторых работах показана ассоциация перечисленных генов с развитием диабета и остеоартрита, в других исследованиях таких связей не выявлено. Рассмотрены работы, посвященные описанию клинической характеристики ОА, ассоциированного с СД. Показана патогенетическая роль хронической гипергликемии, инсулино-резистентности, конечных продуктов гликирования (advanced glycation age products, AGE) в развитии ОА и осложнений СД. Обсуждаются механизмы развития воспаления, гуморального и клеточного иммунного ответа к компонентам хряща, участие этих механизмов в прогрессии ОА. Подчеркивается сходство механизмов вялотекущего воспаления у больных ОА и сосудистых осложнений сахарного диабета. Заключается, что ДАОА не является простым механическим сочетанием двух заболеваний. ОА и СД имеют некоторые сходные генетические, патогенетические механизмы, особый фенотип болезни и нацеливают врача, ученого на новый, холистический (персонифицированный) подход к профилактике, диагностике, лечению и прогнозу этой коморбидной патологии. Рассматриваются возможности фармакотерапии ДАОА, учитывающей ключевую характеристику коморбидных заболеваний – эмерджентность (возникающие свойства). Предполагается, что изучение универсальных сетевых взаимодействий, происходящих на геномном, молекулярном, клеточном уровнях, которые приводят к поражению различных органов-мишеней, позволит успешно использовать подход «сетевой фармакологии» в терапии коморбидных заболеваний. Приводятся примеры успешного использования такого лечения при некоторых полипатиях (фармакологический агонист PPAR α фенофибрат, ингибитор ГМГ-КоА редуктазы симвастатин при ОА, РА и псориазе). Обсуждается реальность этих подходов в терапии ДАОА. В частности, приводится пример использования в пилотных исследованиях донатора метильной группы адеметионина.

Ключевые слова: диабет-ассоциированный остеоартрит, коморбидность, сахарный диабет 2 типа, остеоартрит, генетика, иммунопатогенез

Адрес для переписки:

Казыгашева Елена Владимировна
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: elena.kazygasheva@mail.ru

Address for correspondence:

Kazygasheva Elena V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630047, Russian Federation, Novosibirsk, Yadrintsevskaya, 14.
Phone: 7 (923) 107-51-00.
Fax: 7 (383) 228-25-47.
E-mail: elena.kazygasheva@mail.ru

Образец цитирования:

Е.В. Казыгашева, В.С. Ширинский, И.В. Ширинский
«Диабет-ассоциированный остеоартрит – синтропия?»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 317–330.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-317-330

© Казыгашева Е.В. и соавт., 2016

For citation:

E.V. Kazygasheva, V.S. Shirinsky, I.V. Shirinsky “Diabetes-associated osteoarthritis: a syntropy?”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 317–330. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-317-330

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-317-330>

DIABETES-ASSOCIATED OSTEOARTHRITIS: A SYNTROPY?

Kazygasheva E.V., Shirinsky V.S., Shirinsky I.V.

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

Abstract. This review presents our own and literature data dedicated to predisposing and pathogenetic factors involved in development of a common comorbidity, diabetes-associated osteoarthritis (DAOA). So far, there is no wide-accepted clinical or scientific viewing of DAOA as a distinct clinical phenotype of osteoarthritis (OA). To our knowledge, the role of genetic factors in DAOA development was not discussed in details. Therefore, we have drawn attention to the cross-acting genes involved in both OA and diabetes, i.e., PPAR γ , FTO, ADIPOQ, and AGE. These genes encode proteins which can contribute to the pathogenesis of both OA and diabetes. However, some controversies exist about genetic predisposal for OA and diabetes. We review the studies which concern various clinical characteristics of DAOA. We describe a role of chronic hyperglycemia, insulin resistance, advanced glycation end-products (AGE) in development of OA and micro- and macrovascular complications of diabetes. The mechanisms of low-grade inflammation, humoral and cellular immune responses to cartilage antigens, and their role in OA progression are discussed. We underline a similarity of low-grade inflammation in OA and microvascular complications in diabetes. In conclusion, OA and diabetes comorbidity is not a mere coincidence of these diseases. They share some common genetic and pathogenetic factors, a distinct phenotype, and may change thinking of physicians and scientists towards a holistic (personalized) approach to prevention, diagnosis, treatment and prognosis of this comorbidity. We discuss opportunities of DAOA pharmacotherapy based on the key comorbidity feature, i.e., emergence of a new disease property by coexistence of several diseases. One may hypothesize that studying genetic, molecular, and cellular networks in comorbidities may lead to new treatment strategies ('network pharmacology') based on targeting the network hubs. We provide examples of such approach in some polyopathies (e.g., phenofibrate, a PPAR α agonist; simvastatin, a GMG-CoA reductase in OA, rheumatoid arthritis and psoriasis), and its potential usefulness is discussed for DAOA. In particular, we provide an example of a pilot study of ademethionine, a methyl group donator.

Keywords: diabetes-associated osteoarthritis, comorbidity, type 2 diabetes, osteoarthritis, genetics, immunopathogenesis

Введение

Остеоартрит (ОА) является одной из актуальных проблем клинической медицины не только вследствие большой распространенности, но и повышенной частоты коморбидной патологии: ожирение, сахарный диабет (СД), артериальная гипертензия (АГ), инсулинорезистентность, дислипидемия [9, 12]. Перечисленные заболевания относятся к факторам риска развития другой, наиболее грозной группе болезней — сердечно-сосудистых заболеваний, обусловленных атеросклерозом [2, 11]. Видимо, неслучайно смертность больных ОА в 40% обусловлена атеросклерозом сосудов сердца [2, 12] и ассоциирована с высоким уровнем бремени болезни, пожилым возрастом и наличием коморбидных заболеваний.

Патогенез ОА связывают с взаимосвязанной комбинацией множества факторов (генетических, эпигенетических, биомеханических, метаболических и др.), которые в итоге приводят к развитию воспаления во всех структурах сустава, вовлечению в процесс клеток иммунной системы, жировой ткани, их медиаторов и формированию разнородных по фенотипу и этиопатогенезу клинических вариантов (субтипов) болезни [7]. К числу особых субтипов ОА отно-

сится ОА, ассоциированный с СД (ДАОА) [8, 23, 33, 64]. Основанием для выделения этого варианта ОА являются результаты исследований о повышенной частоте СД у больных ОА и высокий риск развития ОА у больных с СД. Так, показано, что сахарный диабет 2 типа (СД 2 типа) встречается у больных ОА значительно чаще (30%), чем в общей популяции (13%) [56]. С другой стороны, в поперечном исследовании, проведенном отечественными авторами, установлено, что у больных СД 2 типа в возрасте 44–82 лет клинико-рентгенологические признаки ОА регистрировались у 60% больных, тогда как в контрольной группе лиц без СД, сопоставимой по полу, возрасту, индексу массы тела — у 42,5% обследуемых [4]. В продольном популяционном наблюдении за 927 мужчинами и женщинами в течение 20 лет было выявлено, что СД является независимым фактором риска эндопротезирования суставов (ОР — 2,1, ДИ — 1,0–3,8) [63].

Эти данные позволили предположить, что частое сочетание СД и ОА обусловлено их патогенетическим сходством, а сама комбинация относится к группе синтропных коморбидных болезней [21, 22], характеризующихся особыми, недостаточно описанными клиническими проявлениями, малоизученным патогенезом и требующих новых подходов к терапии. Напомним,

что синтропия — это природно-видовое явление, заключающееся в сочетании двух и более патологических состояний (нозологий, синдромов) у больного и его ближайших родственников, которое не является случайным, а имеет эволюционно генетическую основу [15]. Неслучайность сочетания обусловлена сходством патогенеза и участием общих («синтропных») генов предрасположенности к развитию отдельных заболеваний и формированию конкретной синтропии.

Цель обзора — провести анализ данных литературы и результатов собственных исследований о генетике ДАОА, его патогенезе, клинических проявлениях и перспективах лечения.

К настоящему времени у исследователей и клиницистов пока не сложилось четкого представления о ДАОА как отдельном клиническом варианте ОА. Видимо, поэтому не удалось найти в литературе работ, посвященных изучению роли генетических факторов в развитии именно этого субтипа болезни. Поскольку морфогенез и функционирование всех структур сустава при ОА генетически детерминированы, знание молекулярно-генетических основ формирования ДАОА важно для понимания общих механизмов патогенеза СД и ОА, приводящих к появлению именно этой коморбидности. Имеется достаточное количество исследований, посвященных изучению роли наследственности в развитии СД и ОА как самостоятельных нозологических форм заболеваний. Они обобщены в ряде обзоров, к некоторым из которых мы отсылаем заинтересованного читателя [6, 10, 17, 45]. Здесь мы ограничимся лишь основополагающими сведениями о структуре таких исследований и их основных результатах.

Роль генетических факторов в развитии ОА и СД 2 типа

Гены, которые предположительно влияют на морфологию хряща и околосуставных тканей при ОА (гены-кандидаты), подразделяют на две группы: структурные гены и гены, регулирующие экспрессию генов соединительной ткани [17]. К структурным генам относят гены, кодирующие преимущественно белки матрикса соединительной ткани — COL2A2 —COL9A1, кодирующие одноименные коллагены; COMP, кодирующий олигомерный матриксный протеин хряща; ACAN, кодирующий агрекан и др. [17]. К числу генов второй группы относят гены, регулирующие GDF5 (Growth differentiation factor 5), отвечающий за начальные этапы остео- и хондрогенеза, SMAD3 (Mothers against decapentaplegic homolog 3), который регулирует активность TGF β , DVWA, контролирующие продукцию белка межклеточного матрикса и др. При изучении этих генов выявляют структурные нарушения (мутации, полиморфизмы) и экспрес-

сию РНК, синтезируемую с этих генов в тканях сустава. Так, в исследовании Ala-Kokko L. et al. было показано, что замена аргинина на цистеин в позиции 519 гена COL2A1 приводит к возникновению раннего ОА и хондродисплазии у членов семьи, в которой регистрировались случаи заболевания [28]. Установлена ассоциация полиморфного варианта rs11842874 гена MCF2L, продукты которого регулируют активность фактора роста нервов (NGF), с риском развития ОА крупных суставов (ОР — 1,17, ДИ — 1,11-1,23) в европейской популяции [26].

Маркер rs143383 локуса гена GDF5 (Growth differentiation factor 5) ассоциирован с риском возникновения гонартроза в тайской популяции [67]. Напомним, что фактор роста и дифференцировки 5 относится к числу ростовых факторов семейства TNF β , играет ключевую роль в процессе остео- и хондрогенеза.

Предполагается, что важная роль в развитии ОА принадлежит воспалению и изменениям в иммунной системе [34]. В связи с этим был проведен ряд исследований по изучению ассоциаций полиморфных вариантов генов провоспалительных цитокинов с развитием ОА и его клинических вариантов [52]. Так, в работе Nakki et al. установлена связь полиморфизма rs2287047 гена рецептора IL-1 (IL1R1) с развитием ОА кисти [53]. Показано, что в корейской популяции полиморфные варианты TNF α -G308A и TNF β +G252A предрасполагают к развитию ОА [47]. Попытка выявить общие гены ОА и СД была предпринята в исследовании Cheng et al., посвященном изучению связи полиморфизма генов PPAR γ с возникновением ОА и его тяжестью в франко-канадской популяции [37].

Интерес исследователей к рецепторам, активируемым пероксисомным пролифератором (PPAR), обусловлен широким спектром их биологической активности. Они относятся к числу ядерных рецепторов, выполняющих функцию факторов транскрипции, и обладают многофункциональными свойствами: контролируют воспаление, изменяя продукцию про- и противовоспалительных медиаторов, липидный обмен, инсулинорезистентность, уровень адипокинов и др. [22, 36]. Авторам одной работы не удалось найти статистически значимых различий полиморфизма гена PPAR γ (Pro12Ala и C1431T) у больных ОА и здоровых, ассоциаций полиморфизма с тяжестью болезни [37]. В то же время при обследовании лиц китайской популяции установлена ассоциация полиморфизма rs12629751 гена PPAR γ с риском возникновения ОА коленных суставов (отношение шансов 0,341, 95% ДИ 0,173-0,673) [75]. Примечательно, что аллель Pro12Ala PPAR γ ассоциирован с риском развития

СД 2 типа и инсулинорезистентности у французов [43]. Сходные данные получены при обследовании лиц, проживающих в Египте [62].

Современные методы полногеномного исследования — Genome-Wide Association Studies (GWAS) — позволяют выявить ассоциации заболеваний с сотнями тысяч полиморфных вариантов генов. С целью изучения наследственных факторов риска развития ОА были созданы консорциумы в Великобритании (ArcOGEN) и Европейском союзе (TREAT — OA) [17]. Некоторые итоги работы консорциумов изложены в обзорах [17, 45], здесь представим лишь основные результаты.

Обнаружено 11 локусов генов, которые наиболее значимо ассоциируются с развитием ОА крупных суставов и экспрессируют белки, участвующие в метаболизме матрикса хряща. Эти гены выявляются преимущественно у европеоидов [17, 45]. Подчеркивается, что среди этих генов существуют общие гены, например, ген FTO [74], ассоциированные как с риском возникновения ОА крупных суставов у женщин в популяции европеоидов, так и избыточной массой тела. Следует отметить, что при оценке результатов полногеномных исследований возникают определенные трудности. В частности, гены и полиморфизмы, которые сопряжены с риском развития ОА в популяции европеоидов, не работают в азиатских популяциях. Помимо этого, не всегда удается установить механизм действия установленного гена-кандидата. Важно также отметить, что риск развития ОА у носителей гена-кандидата увеличивается незначительно, в среднем на 15-20%. Предполагается, что увеличение информативности может быть достигнуто путем одновременной оценки 2-3 генов-кандидатов [45], которые могут быть в каждом конкретном случае индивидуально объединены.

Несмотря на существенный прогресс в понимании роли генетических факторов в развитии ОА, имеются и единичные противоречивые результаты. Так, в четырех поколениях семьи жителей Нидерландов с ранним ОА не выявлено связи 14 основных генов ОА (гены коллагенов разных типов, металлопротеиназ, COMP и др.) с риском развития болезни [51].

Краткий анализ данных о роли генетических факторов в развитии ОА свидетельствует о том, что эта область исследований стремительно развивается и уже достигнуты определенные успехи в понимании наследственного компонента болезни. Однако это касается только ОА как самостоятельного заболевания, без учета коморбидной патологии, в том числе часто встречающегося СД, который может предшествовать ОА или возникать в период уже сформировавшейся

клинико-рентгенологической картины болезни. Вероятно, изучение роли наследственных факторов в возникновении ДАОА станет возможным тогда, когда на основе особенностей клинической и рентгенологической картины для этого субтипа болезни будут разработаны классификационные (диагностические) критерии, которые четко определяют его место среди других клинических вариантов ОА.

Изучение роли генетических факторов в развитии СД 2 типа в последние годы привлекает все большее внимание исследователей. Были определены более 100 генов, большинство из которых участвуют в патогенезе дисфункции β -клеток и инсулинорезистентности, конечных продуктов гликирования (RAGE) и ассоциированы с риском развития СД 2 типа и его осложнений [6, 71]. Проблема осложняется тем, что СД 2 типа представляет собой крайне гетерогенную группу больных с разным фенотипом, генотипом и патогенезом [69]. Неудивительно, что частота отдельных субтипов болезни существенно отличается в различных этнических группах [69], что затрудняет разработку единых согласительных рекомендаций по ведению больных. Здесь мы обратим внимание на перекрестные гены-кандидаты риска развития как СД 2 типа, так и ОА: PPAR γ (Peroxisome Proliferator- Activated Receptor gamma (PPAR γ)), FTO (Fat mass and obesity-associated protein), представляющий собой фермент α кетоглутарад-зависимую диоксигеназу FTO, ADIPOQ (ген адипонектина), RAGE (Receptor of Advanced Glycation End Products Gene), которые экспрессируют белки, потенциально способные участвовать в патогенезе ОА и СД.

Показано, что среди жителей Китая у носителей полиморфизма rs12629751 гена PPAR γ риск возникновения ОА коленных суставов увеличивается на 34% [75], а у французов и египтян аллель Pro12Ala PPAR γ ассоциирован с риском развития СД 2 типа и инсулинорезистентности [43, 62].

Ген FTO ассоциировался с развитием ОА кисти у профессионально активных женщин-финских стоматологов и преподавателей в возрасте 45-63 лет [65], некоторые полиморфизмы гена FTO в популяции европеоидов, жителей Индии, были связаны с риском развития СД 2 типа, в ряде случаев наблюдалась слабая перекрестная связь с избыточной массой тела [58, 73].

Ген адипонектина (ADIPOQ) — белок, секретируемый адипоцитами, имеет широкий спектр биологической активности, в том числе влияет на чувствительность тканей к инсулину [38]. Его роль в развитии ОА остается неясной, обсуждается протективная и защитная роль адипонектина в развитии ОА [38]. Выявлена ассо-

ция гена ADIPOQ с риском развития СД 2 типа во французской, шведской, японской популяциях, не была выявлена у индейцев племени Пима и афроамериканцев [6]. В тайской популяции не было установлено связи полиморфизма + 276G/T (rs1501299) гена ADIPOQ с риском возникновения ОА коленных суставов [41].

В результате метаанализа исследований, посвященных связи RAGE с развитием СД 2 типа и его осложнений, установлены ассоциации 1704T аллеля гена RAGE с повышенным риском СД и диабетической ретинопатии (ОР — 1,21, ДИ — 1,04-1,40) [72]. Примечательно, что этот эффект был более выражен в странах Восточной Азии. В популяции жителей Китая 82G/S полиморфизм гена RAGE был сопряжен с риском развития ОА коленных суставов (ОР — 1,44, ДИ — 1,13-1,82) [48].

Следует помнить, что на пути реализации генетической программы болезни у лиц, предрасположенных к ОА и СД 2 типа, стоят механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов, связанных с метилированием ДНК, модификацией гистонов и участием некодирующих малых РНК. Они влияют на экспрессию генов без первичного изменения ДНК, регулируя транскрипцию и с помощью посттранскрипционных механизмов. Детальное описание этих сложных механизмов, которые интенсивно изучаются в последние годы при ОА и СД 2 типа, представлено в ряде обзоров [17, 44, 45]. Необходимо отметить, что изучение эпигенетической регуляции при полигенных, мультифакториальных, хронических заболеваниях, в том числе ОА, СД 2 типа, находится в самом начале пути и пока не коснулось коморбидной патологии. Актуальность таких исследований, результаты которых сулят новые возможности профилактики и лечения хронических неинфекционных заболеваний человека, не вызывает сомнений.

Клиническая характеристика ДАОА

Описанию клинической картины ДАОА посвящено несколько работ. Показано, что ДАОА страдают преимущественно женщины пожилого возраста с избыточной массой тела, у большинства из них выявляются клиничко-рентгенологические признаки генерализованного ОА, с преобладающим поражением опорных суставов — тазобедренных и коленных, частым вовлечением в процесс периартикулярных тканей [4, 8, 23]. Отмечается, что темпы рентгенологической прогрессии у больных ДАОА в 2,2 раза больше, чем у пациентов с ОА без СД 2 типа [8]. Больные ДАОА характеризуются большим уровнем боли в пораженных суставах, увеличением продолжительности утренней скованности, более высоким уровнем снижения функции опорных суставов

и кисти, качества жизни, выраженной тяжестью болезни [8, 23, 49]. Тяжелые проявления суставного синдрома чаще выявляются у больных с плохо контролируемым СД 2 типа, вынужденных принимать препараты инсулина [23]. Показано, что у больных ДАОА повышен индекс тяжести коморбидности, обусловленный преобладанием среди них пациентов, имеющих инвалидность по основному или сопутствующим заболеваниям и большой объем комбинированной фармакотерапии. Отмечается, что у больных ДАОА, в сравнении с группой пациентов без СД, более выражены лабораторные признаки вялотекущего системного воспаления, деструкции хряща и дислипидемии [25]. Таким образом, результаты этих немногочисленных исследований свидетельствуют о своеобразии клинической картины ОА, ассоциированного с СД 2 типа, и позволяют предполагать участие СД в развитии и прогрессии ОА путем характерных для СД патофизиологических механизмов: глюкозотоксичности, инсулинорезистентности, патологическом действии конечных продуктов гликирования. Напомним, что эти механизмы лежат в основе клинических проявлений СД и формирования его осложнений [16].

Хроническая гипергликемия, инсулинорезистентность, конечные продукты гликирования — роль в патогенезе ОА и СД

Согласно определению, ОА — это гетерогенная группа заболеваний различной этиологии, со сходными биологическими, морфологическими и клиническими исходами, при которых в патологический процесс вовлекается не только суставной хрящ, но и весь сустав, включая субхондральную кость, связки, капсулу, синовиальную оболочку и периартикулярные мышцы [1]. В этом разделе обзора будут представлены данные, касающиеся влияния диабета в первую очередь на изменение хрящевой ткани.

Здоровье суставного хряща определяется целостностью внеклеточного матрикса (ВКМ) и жизнеспособностью хондроцитов, продуцирующих этот матрикс. Основу поддержания целостности суставного хряща составляет ремоделирование ВКМ хондроцитами [20]. С точки зрения молекулярной биологии суставной хрящ взрослого здорового человека обычно классифицируется как постмитотическая ткань с незначительной активностью обменных процессов [20]: низким уровнем экспрессии коллагена II типа, отсутствием экспрессии коллагенов I, III или X типов, относительно высоким обменом агрекана и ограниченной репликацией хондроцитов. Он также характеризуется незначительной экспрессией ростовых факторов-TGF- β 1, полным отсутствием экспрессии TGF- β 2, FGF-2, инсу-

линового ростового фактора (IGF)-I и Ihh, а также малой скоростью апоптоза хондроцитов [20]. Поэтому неслучайно содержание глюкозы — основного источника энергии клеток — в хондроцитах значительно ниже, чем в синовиальной жидкости и плазме [64]. Доставка глюкозы в хондроциты осуществляется белками-транспортерами GLUT-1 (основной транспортер) и GLUT-3 без участия инсулина. Хондроциты здоровых людей, даже при высоком внеклеточном содержании глюкозы (30 мм), экспрессируют небольшое количество GLUT-1, в результате чего концентрация глюкозы внутри клетки существенно не увеличивается [60, 64]. Показано, что хондроциты больных ОА *in vitro* при тех же уровнях внеклеточной глюкозы накапливают ее в большей концентрации за счет увеличения экспрессии GLUT-1 [59]. Избыточное внутриклеточное содержание глюкозы полностью не метаболизируется с помощью инсулина, поскольку его внутриклеточный транспорт ограничен. Выявлено, что на клетках культуры хондроцитов от больных ОА *in vitro* и *in situ* в суставном хряще снижена экспрессия рецепторов к инсулину и инсулиноподобному фактору роста [61], что приводит к снижению фосфорилирования АКТ1-киназы и способствует уменьшению синтеза агрекана и коллагена II. Увеличение содержания глюкозы внутри хондроцита у больных ОА инициирует накопление активных форм кислорода («окислительный стресс») и активирует каталитические программы, связанные с продукцией различных металлопротеиназ и коллагеназ [33, 64]. Это приводит к гибели клеток и разрушению матрикса хрящевой ткани.

Глюкозотоксичность, инсулинорезистентность, вероятно, являются патогенетическими факторами развития ОА *in vivo*. Установлено, что длительная гипергликемия у женщин без клинических проявлений СД приводит через 2 года к статистически значимой убыли хрящевой ткани и изменениям структуры субхондральной кости коленных суставов [39].

В последние годы все большее внимание исследователей разных специальностей привлекает изучение роли ранних и поздних продуктов гликирования белков в патогенезе различных заболеваний человека, коморбидной патологии и поиска в этом направлении потенциальных терапевтических мишеней. Результаты этих исследований представлены в ряде обзоров [3, 16, 18, 27].

Неферментативное гликирование — классическая ковалентная реакция между альдегидной или кето-группой глюкозы, других сахаров со свободными аминогруппами [3, 18]. Гликирование белков происходит по остаткам лизина,

аргинина, гистидина, триптофана, цистеина. Путем N-гликозидного связывания, через серию химических реакций, образуется большое число сахар-протеиновых комплексов. В сложной цепи последовательных реакций формируются продукты раннего гликирования (продукт Амадори) и позднего гликирования — AGE (Advanced Glycation End Products). Интенсивность реакции определяется уровнем гликемии и периодом полужизни белков, вступающих в реакцию. При СД, в условиях гипергликемии, содержание гликированных протеинов существенно возрастает [16, 27]. Наиболее подвержены гликированию долгоживущие белки, такие как коллаген, кристаллин и др. Существует множество продуктов присоединения глюкозы и белков тканей и жидкости организма *in vivo*. Этими белками могут быть ферменты, гормоны, рецепторы, другие биологически активные вещества.

Следует отметить, что AGE-модифицированные продукты могут распадаться только вследствие внутриклеточного протеолиза, преимущественно фагоцитирующими клетками, что непременно инициирует процесс воспаления [27]. Основные биологические эффекты AGE опосредуются через мультилигандный рецептор семейства иммуноглобулинов (RAGE) и галектин-3, которые экспрессируются на фибробластах, макрофагах, Т-лимфоцитах, мезенгиальных клетках, эндотелиальных и гладкомышечных клетках сосудов, клетках мозга, печени, хондроцитах [18]. Взаимодействие AGE с рецепторами клеток приводит к выделению провоспалительных молекул и свободных радикалов, способствуя поддержанию хронического воспаления. Это обусловлено наличием ряда специфических для RAGE лигандов, в частности кальгранулинов и белка амфотерина (High Mobility Group Box Protein 1 — HMGB-1), являющегося ключевым медиатором воспаления [18]. Известно, что амфотерин может взаимодействовать не только с RAGE, но и с Toll - подобными рецепторами (TLR-2 и TLR-4) макрофагов [18]. Считается, что AGE, глюкозотоксичность, инсулинорезистентность играют ключевую роль в развитии клинических проявлений СД, формировании диабетических макро- и микрососудистых осложнений [55], присоединении коморбидных заболеваний: атеросклероз, болезнь Альцгеймера, рак, остеоартрит и др. [3]. Оказалось, что эти закономерности выявляются не только при СД, но и ОА.

В основополагающей работе Chen et al. [36] клетки культуры хондроцитов человека стимулировали суммарными конечными продуктами гликирования (AGEs). Установлено, что в результате взаимодействия AGEs, RAGE и TLR-4 увеличивается продукция хондроцитами метал-

лопротеиназы-13, IL-6, ЦОГ-2 и амфотерина, снижается экспрессия коллагена II. Эти эффекты опосредуются активацией p38MAPK, NF-κB и угнетением активности фактора транскрипции RPARγ. По мнению авторов работы, выявленные изменения свидетельствуют о ключевой провоспалительной роли конечных продуктов гликирования в патогенезе ОА, ассоциированного с СД.

Итак, краткий анализ данных литературы, посвященных роли хронической гипергликемии, инсулинорезистентности, AGE в патогенезе ОА и СД свидетельствует о патогенетическом сходстве этих двух заболеваний и позволяет предполагать, что частое сочетание СД и ОА не является случайным. Здесь уместно привести результаты двенадцатилетнего наблюдения за людьми среднего и пожилого возраста, некоторые из них страдали ОА [57]. Оказалось, что у женщин с ОА относительный риск развития СД 2 типа составляет 1,27 (ДИ 1,15-1,41). Это может быть еще одним аргументом в пользу предположения о патогенетическом родстве СД и ОА, и главным механизмом, объединяющим оба заболевания, может быть вялотекущее системное воспаление [5, 33].

Воспаление, нарушение иммунной системы при ОА и СД 2 типа

Долгое время ОА считался болезнью «износа» хряща вследствие нарушения конгруэнтности суставных поверхностей при действии механических факторов, приводящих к разрушению хрящевой ткани [42]. Прогресс в молекулярной биологии в 90-е годы прошлого столетия глубоко изменил эту парадигму. Открытие того, что многие растворимые провоспалительные медиаторы могут увеличивать продукцию матричных металлопротеиназ, коллагеназ хондроцитами, стали первым шагом в формировании «воспалительной» теории развития ОА [34]. Помимо этого, представление об ОА как патологии только хрящевой ткани претерпело существенное изменение. Стало очевидным, что в патологический процесс при ОА вовлекаются все структуры сустава, в том числе субхондральная кость [34]. В 2012 году в журнале Osteoarthritis and Cartilage был опубликован систематизированный обзор, посвященный изучению роли воспаления, иммунных нарушений при ОА [40]. Авторы обзора, используя различные базы данных за период 1946 по 2011 годы, обобщили результаты исследований, посвященных воспалению при ОА, представленные в 100 статьях. Материал для изучения синовиальной ткани, жидкости в большинстве исследований был получен при артроскопии или операции артропластики. Большинство исследований обнаруживают при остеоартрите патоморфологические признаки легкого или умеренного синовита, характеризующегося

гиперплазией синовиальной оболочки, с преимущественным увеличением выстилающих клеток и инфильтрацией синовиальных клетками с различным фенотипом. Некоторые исследователи выявляли в синовии морфологические признаки фиброза. Среди клеток инфильтрата преобладали макрофаги и Т-лимфоциты. По данным Pessler et al., макрофаги составляют примерно 65%, Т-лимфоциты – 22%, В-лимфоциты – 5%, плазматические клетки – менее 1% клеток инфильтрата [54]. Макрофаги располагаются в основном в выстилающем слое синовиальной, субпопуляционная структура макрофагов не изучена.

Т-лимфоциты обнаружены в субповерхностном слое синовиальной оболочки и, в меньшей степени, в глубоком слое, преобладали активированные CD4⁺Т-клетки. Выявлены различные субпопуляции Т-клеток, экспрессирующих активационные антигены: CD69, CD25, CD38, CD45RO, CD60, CD83, HLA II класса. Ряд авторов указывает, что соотношение CD4⁺/CD8⁺ лимфоцитов равнялось 5:1, оно было больше, чем у здоровых людей, и меньше, чем у больных ревматоидным артритом (РА).

Популяция Th-лимфоцитов представлена субпопуляциями Th1, Th2, Th3, Th17, Th9, Th22, соотношение Th1/Th2 было 1,5 в сравнении с РА – 6,1. Показано наличие в синовиальной ткани больных ОА Treg, регуляторных Tr1 лимфоцитов – продуцентов IL-10 и TGF-β [32].

Содержание В-лимфоцитов, плазматических клеток в синовиальной ткани больных ОА было больше, чем у здоровых людей, и меньше, чем у больных РА. Считается, что В-лимфоциты инфильтрата являются олигоклональными и играют существенную роль в развитии ОА [40].

Некоторые авторы обнаружили в синовии больных ОА тучные клетки, причем содержание этих клеток было больше, чем у здоровых людей и больных РА. Тучные клетки локализовались преимущественно периваскулярно в субповерхностном слое синовиальной, многие из них были дегранулированы [40].

Большинство исследователей выявили в синовиальной ткани больных ОА большое число цитокинов, связанных с клетками как врожденного, так и приобретенного иммунитета, в ряде исследований источником цитокинов не был идентифицирован. Выявлялись как провоспалительные, так и противовоспалительные цитокины: IL-1β, TNFα, IFNγ, IL-4, IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18. Кроме того, некоторые исследователи выявили IL-5, IL-13, IL-19, IL-21, IL-26, IL-32, а также TGF-β [40]. В целом большинство авторов приходит к мнению о том, что содержание цитокин-позитивных клеток в образцах синовиальной ткани больных ОА меньше, чем у больных РА, но

выше, чем в синовиальной ткани здоровых людей. Это указывает на то, что синовиальная ткань больных ОА характеризуется вялотекущим воспалением, что отличает его от РА [40].

В результате воспаления в синовиальной ткани провоспалительные медиаторы попадают в синовиальную жидкость и затем в хрящ, действуя катаболической функции хондроцитов [30] и способствуя их гибели. Помимо провоспалительных медиаторов синовиальной ткани и жидкости, вызывающих нарушение процессов ремоделирования хрящевой ткани, важная роль в процессах катаболизма принадлежит субхондральной кости [30]. Напомним, что хрящ и субхондральная кость в норме представляют собой единую биоконструкцию, адаптированную к действию механических нагрузок и осуществляющую тесные молекулярно-клеточные взаимодействия, направленные на физиологическое ремоделирование как хрящевой, так и костной ткани. При ОА, в результате воспаления хряща и субхондральной кости, в процессе ремоделирования катаболические механизмы начинают преобладать над анаболическими. Этому способствует наличие между хрящевой и костной тканью особых сигнальных путей [30], обеспечивающих обмен провоспалительными медиаторами и персистенцию воспаления.

Итак, ОА характеризуется морфологическими признаками воспаления в синовиальной ткани, однако о соотношении воспаления с клиническими характеристиками ОА известно мало. Неясно, имеется ли связь персистирующего воспаления с различными клиническими фазами ОА (ранние и поздние проявления болезни), прогрессией рентгенологических изменений, уровнем боли, выраженностью функциональных изменений суставов и др. Предстоит большая работа по изучению патогенетической роли воспаления в развитии различных клинических проявлений ОА, поскольку первые исследования в этом направлении не внесли ожидаемой ясности. Так, в 2011 году опубликована статья, посвященная изучению связи биомаркеров системного воспаления и рентгенологической прогрессией ОА [70]. Авторы работы на большой выборке больных ОА при оценке 17 показателей воспаления в сыворотке периферической крови, включая определение СРБ и ряда провоспалительных цитокинов, не нашли доказательств связи между исследуемыми биомаркерами и наличием рентгенологических проявлений ОА. Авторы объясняют полученные результаты дизайном исследования. Оно было поперечным, и, по их мнению, в продольных исследованиях могут быть получены другие данные. В некоторых исследованиях выявлено, что у больных ОА с клиническими проявлениями

синовита в сыворотке ПК регистрируются маркеры системного воспаления, в частности СРБ, ассоциированный с уровнем боли [66, 68].

Нами было показано, что в сыворотке ПК больных ДАОА повышен уровень провоспалительных (IL-1, IL-18) и снижено содержание противовоспалительных цитокинов (адипонектина, IL-10), а уровень IL-6 прямо коррелировал с рядом функциональных показателей тяжести болезни [23].

Наличие в синовиальной ткани и жидкости больных ОА клеток, участвующих в гуморальном и клеточном иммунном ответе, позволяет предполагать, что их появление обусловлено развитием иммунного ответа к аутоантигенам хрящевой ткани. Напомним, что у здоровых людей потенциальные аутоантигены хряща, находящегося в асептических условиях, изолированы от клеток иммунной системы. При ОА в результате старения хряща, действия механического стресса, катаболических процессов многочисленные высвобождающиеся антигенные детерминанты матрикса хряща могут инициировать и поддерживать гуморальный и клеточный иммунный ответ, способствуя хронизации воспаления в хряще и синовиальной ткани [46]. Действительно, в синовиальной ткани, жидкости, сыворотке периферической крови больных ОА, в отличие от здоровых людей, выявлены антитела к антигенным детерминантам коллагенов II, IX, XI, агрекану, фрагментам фибронектина. Эти антигены входят в состав иммунных комплексов, обнаруженных в матриксе хряща больных ОА [46], они обладают артритогенными свойствами и способны индуцировать артрит у экспериментальных животных. Помимо гуморального иммунного ответа формируется и клеточный иммунный ответ [46] к фрагментам мембраны хондроцитов, ядерным белкам, коллагенам и протеогликанам матрикса. Ситуация осложняется тем, что в условиях хронического воспаления, иммунного ответа к различным аутоантигенам организм использует резервные возможности элиминации аутоантигенов. Поэтому у больных ОА хондроциты приобретают свойства профессиональных антиген-презентирующих клеток, способных фагоцитировать фрагменты коллагена, протеогликанов и взаимодействовать с Т-лимфоцитами, проникающими в поврежденный хрящ из синовиального экссудата [29, 46]. Хондроциты начинают экспрессировать антигены HLA-II, DP, DQ, DR, а также костимуляторные молекулы CD80, CD86 [46], в результате чего происходит усиление пролиферации Т-лимфоцитов и их провоспалительного потенциала.

Итак, анализ данных литературы, посвященных результатам исследования хронического

воспаления и изменений в иммунной системе у больных ОА, убедительно свидетельствует о том, что изменение прежнего названия болезни «остеоартроз» на современное «остеоартрит» оправданно [34]. Это новое понимание патогенеза ОА является принципиальным, поскольку определяет перспективу применения нестероидных противовоспалительных препаратов, антицитокиновых агентов в лечении ОА и поиска новых терапевтических мишеней.

Необходимо еще раз отметить, что в генезе микро- и макрососудистых осложнений СД 2 типа ключевая роль принадлежит вялотекущему воспалительному процессу [5, 13, 14], для которого характерны описанные выше закономерности, и тогда, с определенной мерой условности, можно говорить о патогенетическом сходстве ОА и СД.

Остается неясным, насколько описанные в этом разделе обзора закономерности развития воспаления и иммунного ответа у больных ОА будут характерны при ДАОА. Исследования в этом направлении только начинаются. Так, установлено, что у больных ДАОА содержание антител к коллагену II в сыворотке ПК выше, чем у больных ОА, и ассоциируется с тяжестью суставного синдрома [25].

Фармакотерапия ДАОА отличается от лечения ОА?

Если фармакотерапия СД 2 типа достаточно хорошо разработана, то лечение ОА представляет собой серьезную проблему. Главной целью выделения фенотипических вариантов течения ОА, включая ДАОА, считают индивидуализацию лечения ОА, поскольку очевидно, что различные патогенетические и клинические фенотипы ОА требуют разных терапевтических стратегий [7]. Важным шагом повышения эффективности лечения следует считать то, что в последних международных и отечественных рекомендациях по лечению остеоартрита предусмотрена необходимость учета коморбидной патологии при назначении терапии [19, 35, 50]. Однако в этих согласительных документах ОА и сопутствующая коморбидная патология рассматриваются самостоятельно, без их возможной патогенетической связи. Мы полагаем, что коморбидные заболевания не есть простое сочетание нескольких болезней, их фенотип, патогенез есть новое целое с малоизученными эмерджентными свойствами и иными возможностями терапии, на основе сходства патогенеза [21, 22]. Еще раз подчеркнем, что «возникающие» свойства сложных биологических систем (эмерджентность), характерные для полипатий, невозможно объяснить только с точки зрения их составляющих (отдельных болезней). Патогенез отдельных и коморбидных заболеваний связан, по мнению Барабаша, с из-

менениями универсальных сетевых процессов, происходящих на геномном, молекулярном, клеточном уровнях, которые приводят к поражению различных органов-мишеней [31].

Это положение является ключевым в системной биологии и медицине и фундаментальной основой понимания развития синтропий. При этом следует помнить, что метаболические сети — это графическое изображение взаимодействующих белков, углеводов, липидов и др., которые функционируют совместно и координированно, контролируя взаимосвязанные процессы в организме [31]. Элементами сети являются узлы, связанных друг с другом ориентированными (фермент—субстрат, ген—белок и др.) и неориентированными ребрами.

Выделяют центральные (хабы), имеющие большее количество связей, и периферические, имеющие меньшее количество связей, узлы сети. Хорошо изучены такие центральные узлы межмолекулярных взаимодействия как глюкокортикоидные рецепторы, рецепторы витамина D, метилтрансфераза ДНК, NF-κB, PPAR и ряд других [22]. Узлы разнородны по своей структуре: рецепторы клеточной поверхности, внутриклеточные рецепторы, ферменты, ионные каналы и др., однако все они обладают некоторыми сходными свойствами:

- хабы регулируют взаимосвязь различных путей метаболизма, воспаления, иммунных реакций и др.;

- изменение активности центральных узлов способствует развитию коморбидной патологии;

- хабы являются потенциальной терапевтической мишенью, и их модуляция может обеспечить многоцелевые эффекты, в том числе при коморбидной патологии.

Поиск мишеней терапии, основанный на изучении свойств молекулярных сетей, получил название «сетевая фармакология».

Ранее нами было высказана гипотеза, что в результате фармакологического вмешательства на центральные узловы элементы при использовании агонистов или антагонистов может развиваться плеiotропный эффект (противовоспалительный, иммуномодулирующий, липидкорректирующий, антиангиогенный, противоостеопоретический и др.), приводящий в итоге к формированию клинического эффекта не только основного, но и сопутствующих заболеваний. Эта гипотеза была подтверждена на примерах использования фармакологического агониста PPARα фенофибрат, ингибитора ГМГ КоА А-редуктазы симвастатина у больных ревматоидным артритом, остеоартритом, псориазом с высоким риском развития атеросклероза. Показана их клиническая эффективность и безопасность, которая в большинстве случаев ассоци-

ировалась с липидкорректирующим и иммуномодулирующим действием [22]. В то же время прием донатора метильной группы адеметионина больными ДАОА оказывал статистически значимый анальгетический эффект, улучшал функцию коленных суставов, но не оказывал плеiotропного действия — не влиял на биомаркеры системного воспаления, разрушения матрикса хряща и гликемии, не изменял липидный профиль [24].

Заключение

В связи с увеличением продолжительности жизни населения человечество вступило в эпоху господства полипатий. На примере ДАОА нам хотелось показать сложность проблемы коморбидности, как в понимании патогенеза, так и в лечении. Анализ данных о роли генетических факторов в развитии ДАОА, некоторых механизмов его формирования свидетельствует о том, что ОА и СД не есть простое, механическое сочетание двух заболеваний. Они имеют некоторые сходные генетические, патогенетические меха-

низмы, особый фенотип болезни и нацеливают врача, ученого на новый, холистический (персонифицированный) подход к профилактике, диагностике, лечению и прогнозу этой коморбидной патологии, разработка которых находится в самом начале своего пути. К аналогичным выводам приходят King K.B., Rosenthal A.K., которые проанализировали данные литературы с 1962 по 2014 год, посвященные влиянию СД на риск развития, течение, прогноз, лечение ОА [49]. Мы пока очень смутно представляем, на каких универсальных принципах должны основываться новые подходы в лечении этой коморбидной патологии. Один из вариантов — широко обсуждаемые в последние годы теории сетевых взаимодействий, сетевая медицина и управление сетями [31]. В рамках этих концепций логичным представляется патогенетическое обоснование узловых терапии коморбидных заболеваний, а примеры ее эффективности и безопасности внушают оптимизм и веру в правильность холистического понимания сути полипатий.

Список литературы / References

1. Алексеева Л.И., Зайцева Е.М. Перспективные направления терапии остеоартроза // Научно-практическая ревматология, 2014. Т. 52, №3. С. 247-250. [Aleksheeva L.I., Zaytseva E.M. Perspective directions of osteoarthritis therapy. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2014, Vol. 52, no. 3, pp. 247-250. (In Russ.)]
2. Анкудинов А.С. Проблемы сердечно-сосудистой коморбидности при остеоартрозе // Современные проблемы ревматологии, 2013. № 5. С. 22-31. [Ankudinov A.S. Problems of cardiovascular comorbidity in osteoarthritis. *Sovremennyye problemy revmatologii = Modern Problems Rheumatology*, 2013, no. 5, pp. 22-31. (In Russ.)]
3. Ансари Н.А., Рашид З. Неферментативное гликирование белков: от диабета до рака // Биомедицинская химия, 2010. Т. 56, № 2. С. 168-178. [Ansari N.A., Rashid Z. Non-enzymatic glycation of protein: From diabetes to cancer. *Biomeditsinskaya khimiya = Biomedical Chemistry*, 2010, Vol. 56, no. 2, pp. 168-178. (In Russ.)]
4. Асфандиярова Н.С., Низов А.А., Нехаева Т.И., Сакаева Н.А., Филатова Т.Е., Журавлева Н.С., Трунина Т.П. Остеоартроз у больных сахарным диабетом 2-го типа // Терапевтический архив, 2013. № 5. С. 44-47. [Asfandiayrova N.S., Nizov A.A., Nekhaeva T.I., Sakaeva N.A., Filatova T.E., Zhuravleva N.S., Trunina T.P. Osteoarthritis in patients with type 2 diabetes. *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archives*, 2013, no. 5, pp. 44-47. (In Russ.)]
5. Бабаева А.Р., Тарасов А.А., Безбородова Т.А., Захарьина О.Н. Концепция системного воспаления в патогенезе диабетической ангиопатии // Вестник ВолгГМУ, 2010. № 1 (33). С. 3-8. [Babaeva A.R., Tarasov A.A., Bezborodov T.A., Zakharina O.N. Concept of systemic inflammation in diabetic angiopathy pathogenesis. *Vestnik Volgmu = Bulletin of Volgograd State Medical University*, 2010, no. 1 (33), pp. 3-8. (In Russ.)]
6. Бондарь И.А., Шабельникова О.Ю. Генетические основы сахарного диабета 2 типа // Сахарный диабет, 2013. № 4. С. 11-15. [Bondar I.A., Shabelnikova O.Yu. Genetic framework of type 2 diabetes mellitus. *Sakharnyy diabet = Diabetes*, 2013, no. 4, pp. 11-15. (In Russ.)]
7. Головач И.Ю. Остеоартрит: фундаментальные и прикладные аспекты этиопатогенеза заболевания — ничего не стоит на месте // Украинский ревматологический журнал, 2014. № 56. С. 4-10. [Golovach I.Yu., Osteoarthritis: fundamental and applied aspects of the etiopathogenesis of the disease - nothing stands still. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal = Ukrainian Journal of Rheumatology*, 2014, no. 56, pp. 4-10. (In Russ.)]
8. Головкина Е.С. Течение гонартроза и коксартроза на фоне сахарного диабета // Боль. Суставы. Позвоночник, 2012. Т. 4, № 8. С. 34-38. [Golovkina E.S. Clinical course of gonarthrosis and coxarthrosis following diabetes mellitus. *Bol'. Sustavy. Pozvonochnik = Pain. Joints. Spine*, 2012, Vol. 4, no. 8, pp. 34-38. (In Russ.)]
9. Денисов Л.Н., Насонова В.А. Ожирение и остеоартроз // Научно-практическая ревматология, 2010. № 3. С. 48-55. [Denisov L.N., Nasonov V.A. Obesity and osteoarthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2010, no. 3, pp. 48-55. (In Russ.)]
10. Забелло Т.В., Миromanов А.М., Миromanова Н.А. Генетические аспекты остеоартрита // Фундаментальные исследования, 2015. № 1. С. 10-15. [Zabello T.V., Miromanov A.M., Smirnova N.A. Genetic aspects of

development of an osteoarthrosis. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2015, no. 1, pp. 10-15. (In Russ.)]

11. Лупанов В.П. Ожирение как фактор риска сердечно-сосудистых катастроф // Российский медицинский журнал, 2003. № 6. С. 331-337. [Lupanov V.P. Obesity is as risk factor for cardiovascular events. *Rossiyskiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2003, no. 6, pp. 331-337. (In Russ.)]

12. Наумов А.В., Верткин А.Л., Алексеева Л.И., Шамуплова М.М., Мендель О.А., Лучихина А.В. Остеоартроз и сердечно-сосудистые заболевания. Общие факторы риска и клиничко-патогенетические взаимосвязи. Оптимизация терапии // Профилактическая медицина, 2010. № 3. С. 35-41. [Naumov A.V., Vertkin A.L., Alekseeva L.I., Shamuplova M.M., Mendel O.A., Luchikhina A.V. Osteoarthritis and cardiovascular diseases. Overall risk factors and clinical and pathogenetic relationship. Therapy optimization. *Profilakticheskaya meditsina = Preventive Medicine*, 2010, no. 3, pp. 35-41. (In Russ.)]

13. Нелаева А.А., Хасанова Ю.В., Хоботова Е.С. Роль провоспалительных цитокинов в развитии и прогрессировании микро- и макроангиопатий у пациентов с сахарным диабетом 2 типа // Ангиология и сосудистая хирургия, 2013. Т. 19, № 3. С. 9-13. [Nelaeva A.A., Khasanov Yu.V., Khobotova E.S. The role of inflammatory cytokines in the development and progression of micro- and macroangiopathy in patients with type 2 diabetes. *Angiologiya i sosudistaya khirurgiya = Angiology and Vascular Surgery*, 2013, Vol. 19, no. 3, pp. 9-13. (In Russ.)]

14. Прудникова М.А. Роль хронического вялотекущего воспаления в развитии микрососудистых осложнений сахарного диабета 2 типа // Эндокринология: новости, мнения, обучение, 2013. № 3. С. 106-110. [Prudnikova M.A. Role of chronic low-grade inflammation in the development of the complications of type 2 diabetes mellitus. *Endokrinologiya: novosti, mneniya, obucheniye = Endocrinology News, Opinions, and Training*, 2013, no. 3, pp. 106-110. (In Russ.)]

15. Пузырев В.П. Генетический взгляд на феномен сочетанной патологии человека // Медицинская генетика, 2008. № 9. С. 3-9. [Puzyrev V.P. Genetic view on the phenomenon of combined pathology in human. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2008, no. 9, pp. 3-9. (In Russ.)]

16. Титов В.Н., Хохлова Н.В., Ширяева Ю.К. Глюкоза, гликотоксичность и продукты гликирования протеинов: роль в патогенезе // Клиническая медицина, 2013. Т. 91, № 3. С. 15-20. [Titov V.N., Khokhlova N.V., Shiryayeva J.K. Glucose, glucotoxins, and protein glycation products: the role in the pathogenesis. *Klinicheskaya meditsina = Clinical Medicine*, 2013, Vol. 91, no. 3, pp. 15-20. (In Russ.)]

17. Тюрин А.В., Хусаинова Р.И., Давлетшин Р.А., Хуснутдинова Э.К. Современные представления о патогенезе и генетике остеоартрита // Медицинская генетика, 2013. № 3. С. 3-10. [Tyurin A.V., Khusainova R.I., Davletshin R.A., Khusnutdinova E.K. Modern views on the pathogenesis and genetics of osteoarthritis. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2013, no. 3, pp. 3-10. (In Russ.)]

18. Успенская Ю.А., Горина Я.В., Салмин В.В., Кувачева Н.В., Фурсов А.А., Пожиленкова Е.А., Салмина А.В. Рецепторы конечных продуктов гликирования белков RAGE: лиганды, биологические эффекты и роль в нейродегенерации // Вестник Новосибирского государственного университета. Серия: Биология, клиническая медицина, 2014. Т. 12, № 4. С. 68-76. [Uspenskaya Yu.A., Gorina Ya.V., Salmin V.V., Kuvacheva N.V., Fursov A.A., Pozhilenkova E.A., Salmina A.V. Receptors glycation end product of proteins RAGE: Ligands, biological effects and role in development of neurodegeneration. *Vestnik Novosibirskogo gosudarstvennogo universiteta. Seriya: Biologiya, klinicheskaya meditsina = Bulletin of the Novosibirsk State University. Series: Biology, Clinical Medicine*, 2014, Vol. 12, no. 4, pp. 68-76. (In Russ.)]

19. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению остеоартроза. Ассоциация ревматологов России, 2013. 19 с. [Federal clinical guidelines for the diagnosis and treatment of osteoarthritis]. *Rheumatologists Association of Russia*, 2013. 19 p.

20. Четина Е.В. Механизмы эмбриогенеза при остеоартрозе: роль дифференцировки хондроцитов в резорбции суставного хряща // Научно-практическая ревматология, 2010. № 3. С. 65-77. [Cetina E.V. The mechanisms of embryogenesis in osteoarthritis: the role of differentiation of chondrocytes in resorption of articular cartilage. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2010, no. 3, pp. 65-77. (In Russ.)]

21. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Коморбидные заболевания – актуальная проблема клинической медицины // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 1. С. 7-12. [Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Comorbid diseases as an important problem of clinical medicine. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 29, no. 1, pp. 7-12. (In Russ.)]

22. Ширинский В.С., Ширинский И.В. Узловая терапия – новая возможность лечения коморбидных заболеваний // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 29, № 4. С. 13-21. [Shirinsky I.V., Shirinsky V.S. Hub therapy as a new opportunity for treatment of comorbid diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = The Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 29, no. 4, pp. 13-21. (In Russ.)]

23. Ширинский И.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С. Клинико-иммунологическая характеристика диабет-ассоциированного остеоартрита // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 87-93. [Shirinsky I.V., Kalynovskaya N.Yu., Shirinsky V.S. Clinical and immunological characteristics of diabetes associated osteoarthritis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 87-93. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-87-92>

24. Ширинский И.В., Сазонова О.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С. Клиническая эффективность и безопасность применения адеметионина у больных диабет-ассоциированным остеоартритом: пере-

крестное пилотное исследование // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 553-560. [Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Kalinovskaya N.Yu., Shirinsky V.S. Clinical efficacy and safety of ademetionine in patients with diabetes associated osteoarthritis: a cross-over pilot study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 553-560. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-6-553-560>

25. Ширинский И.В., Сазонова О.В., Калиновская Н.Ю., Ширинский В.С. Коморбидность, метилирование ДНК и аутоиммунитет при диабет-ассоциированном остеоартрите: поисковое исследование // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 327-334. [Shirinsky I.V., Sazonova O.V., Kalynovska N.Yu., Shirinsky V.S. Comorbidity, DNA methylation and autoimmunity in diabetes associated osteoarthritis: an exploratory study. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 327-334. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-4-327-334>

26. Aaron G., Day-Williams, Southam L., Panoutsopoulou K., Nigel W.A. Variant in MCF2L Is Associated with Osteoarthritis. *Am. J. Hum. Genet.*, 2011, Vol. 89, no. 3, pp. 446-450.

27. Ahmed N., Thornalley P.J. The role of advanced glycation end products in pathogenesis of diabetes complications. *RMJ*, 2009, no. 9, p. 642.

28. Ala-Kokko L., Baldwin C.T., Moskowitz R.W., Prockop D.J. Single base mutation in the type II procollagen gene (COL2A1) as a cause of primary osteoarthritis associated with a mild chondrodysplasia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1990, Vol. 87, no. 17, pp. 6565-6568.

29. Alsalameh S., Jahn B., Krause A., Kalden J.R., Burmester G.R. Antigenicity and accessory cell function of human articular chondrocytes. *J. Rheumatol.*, 1991, Vol. 18, no. 3, pp. 414-421.

30. Ashish R.S., Supriya J., Sang-Soo L., Ju-Suk N. Interplay between Cartilage and Subchondral Bone Contributing to Pathogenesis of Osteoarthritis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, no. 10, pp. 19805-19830.

31. Barabási A.L. Network Medicine – From Obesity to the “Diseasome”. *N. Engl. J. Med.*, 2007, no. 357, pp. 404-407.

32. Battaglia M., Gregori S., Bacchetta R., Roncarolo M.G. Tr1 cells: from discovery to their clinical application. *Semin. Immunol.*, 2006, Vol. 18, no. 2, pp. 120-127.

33. Berenbaum F. Diabetes – induced osteoarthritis from a new paradigm to a new phenotype. *Ann. Rheum. Diseases*, 2011, Vol. 70, no. 8, pp. 1354-1356.

34. Berenbaum F. Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!). *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 16-21.

35. Bruyère O., Cooper C., Pelletier J.P., Branco J., Luisa Brandi M., Guillemin F., Hochberg M.C., Kanis J.A., Kvien T.K., Martel-Pelletier J., Rizzoli R., Silverman S., Reginster J.Y. An algorithm recommendation for the management of knee osteoarthritis in Europe and internationally: a report from a task force of the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO). *Semin. Arthritis Rheum.*, 2014, Vol. 44, no. 3, pp. 253-263.

36. Chen Y.J., Sheu M.L., Tsai K.S., Yang R.S., Liu S.H. Advanced glycation end products induce peroxisome proliferator-activated receptor γ down-regulation-related inflammatory signals in human chondrocytes via Toll-like receptor-4 and receptor for advanced glycation end products. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 6, pp. e66611.

37. Cheng S., Afif H., Martel-Pelletier J., Benderdour M., Pelletier J., Hilal G., Haraoui P., Raynauld J., Choquette D., Fahmi H. Association of polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor γ gene and osteoarthritis of the knee. *Ann Rheum Dis.*, 2006, Vol. 65, no. 10, pp. 1394-1397.

38. Conde J., Scotece M., Gomez R., Lopez V., Gomez-Reino J.J., Gualillo O. Adipokines and Osteoarthritis: Novel Molecules Involved in the Pathogenesis and Progression of Disease. *Arthritis*, 2011, no. 203901.

39. Davies-Tuck M.L., Wang Y., Wluka A.E., Berry P.A., Giles G.G., English D.R., Cicuttini F.M. Increased fasting serum glucose concentration is associated with adverse knee structural changes in adults with no knee symptoms and diabetes. *Maturitas.*, 2012, Vol. 72, no. 4, pp. 373-378.

40. de Lange-Brokaar B.J., Ioan-Facsinay A., van Osch G.J., Zuurmond A.M., Schoones J., Toes R.E., Huizinga T.W., Kloppenburg M. Synovial inflammation, immune cells and their cytokines in osteoarthritis: a review. *Osteoarthritis Cartilage*, 2012, Vol. 20, no. 12, pp. 1484-1499.

41. Dong Zhan, Pongsak Yuktanandana, Wilai Anomasiri, Aree Tanavalee, Sittisak Honsawek. Association of adiponectin +276G/T polymorphism with knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, Vol. 22, p. S237.

42. Felson D.T. Osteoarthritis as a disease of mechanics. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 10-15.

43. Ghossaini M., Meyre D., Lobbens S., Charpentier G., Clément K., Maité Tauber M., Weill J., Froguel P. Implication of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR- γ 2 gene in type 2 diabetes and obesity in the French population. *BMC Med Genet*, 2005, no. 6, p. 11.

44. Goldring M.B., Marcu K.B. Epigenomic and microRNA-mediated regulation in cartilage development, homeostasis, and osteoarthritis. *Trends Mol. Med.*, 2012, Vol. 18, no. 2, pp. 109-118.

45. Gonzalez A. Osteoarthritis year 2013 in review: genetics and genomics. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013, Vol. 21, no. 10, pp. 1443-1551.

46. Guo-Hua Yuan, Kayo Masuko-Hongo, Tomohiro Kato, Kusuki Nishioka. Immunologic intervention in the pathogenesis of osteoarthritis. *Arthritis and Rheumatism*, 2003, Vol. 48, no. 3, pp. 602-611.

47. Han L., Song J.H., Yoon J.H., Park Y.G., Lee S.W., Choi Y.J., Nam S.W., Lee J.Y., Park W.S. TNF- α and TNF- β Polymorphisms are associated with susceptibility to osteoarthritis in a Korean population. *Korean J. Pathol.*, 2012, Vol. 46, no. 1, pp. 30-37.

48. Han Z., Liu Q., Sun C., Li Y. The interaction between obesity and RAGE polymorphisms on the risk of knee osteoarthritis in Chinese population. *Cell Physiol. Biochem.*, 2012, Vol. 30, no. 4, pp. 898-904.
49. King K.B., Rosenthal A.K. The adverse effects of diabetes on osteoarthritis: update on clinical evidence and molecular mechanisms. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015, Vol. 23, no. 6, pp. 841-849.
50. McAlindon T.E., Bannuru R.R., Sullivan M.C., Arden N.K., Berenbaum F., Bierma-Zeinstra S.M., Hawker G.A., Henrotin Y., Hunter D.J., Kawaguchi H., Kwok K., Lohmander S., Rannou F., Roos E.M. Underwood OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 2014, Vol. 22, no. 3, pp. 363-388.
51. Meulenbelt I., Bijkerk C., Breedveld F.C., Slagboom P.E. Genetic linkage analysis of 14 gene loci in a family with autosomal dominant osteoarthritis without dysplasia. *Journal of Medical Genetics*, 1997, Vol. 34, no. 12, pp. 1024-1027.
52. Meulenbelt I., Bos S.D., Kloppenburg M., Lakenberg N., Houwing-Duistermaat J.J., Watt I., de Craen A.J., van Duijn C.M., Slagboom P.E. Interleukin-1 gene cluster variants with innate cytokine production profiles and osteoarthritis in subjects from the Genetics, Osteoarthritis and Progression Study. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 4, pp. 1119-1126.
53. Näkki A., Kouhia S.T., Saarela J., Harilainen A., Tallroth K., Videman T., Battié M.C., Kaprio J., Peltonen L., Kujala U.M. Allelic variants of IL1R1 gene associate with severe hand osteoarthritis. *BMC Med. Genet.*, 2010, no. 11, p. 50.
54. Pessler F., Chen L.X., Dai L., Gomez-Vaquero C., Diaz-Torne C. A histomorphometric analysis of synovial biopsies from individuals with Gulf War Veterans Illness and joint pain compared to normal and osteoarthritis synovium. *Clinical Rheumatology*, 2008, Vol. 27, no. 9, pp. 1127-1134.
55. Petrovič M.G., Steblovník K., Peterlin B., Petrovic D. The - 429 T/C and - 374 T/A gene polymorphisms of the receptor of advanced glycation end products gene are not risk factors for diabetic retinopathy in Caucasians with Type 2 Diabetes. *Biomed. Rep.*, 2014, Vol. 2, no. 2, pp. 229-232.
56. Peunpatom R.A., Victor T.W. Increased prevalence of metabolic syndrome in individuals with osteoarthritis: an analysis of NHANES III data. *Postgrad. Med.*, 2009, Vol. 121, no. 6, pp. 9-20.
57. Rahman M.M., Cibere J., Anis A.H., Goldsmith G.H., Jacek A.K. Risk of type 2 diabetes among osteoarthritis patients in a prospective longitudinal study. *International Journal of Rheumatology*, Vol. 2014, no. 620920.
58. Ramya K., Radha V., Ghosh S., Majumder P.P., Mohan V. Genetic variations in the FTO gene are associated with type 2 diabetes and obesity in south Indians (CURES-79). *Diabetes Technol Ther.*, 2011, Vol. 13, no. 1, pp. 33-42.
59. Rosa S.C., Gonçalves J., Judas F., Mobasher A., Lopes C., Mendes A.F. Impaired glucose transporter-1 degradation and increased glucose transport and oxidative stress in response to high glucose in chondrocytes from osteoarthritic versus normal human cartilage. *Arthritis Res Ther.*, 2009, Vol. 11, no. 3, p. 80.
60. Rosa S.C., Rufino A.T., Judas F., Tenreiro C., Lopes M.C., Mendes A.F. Expression and function of the insulin receptor in normal and osteoarthritic human chondrocytes: modulation of anabolic gene expression, glucose transport and GLUT-1 content by insulin. *Osteoarthritis Cartilage*, 2011, Vol. 19, no. 6, pp. 719-727.
61. Rosa S.C., Rufino A.T., Judas F.M., Tenreiro C.M., Lopes M.C., Mendes A.F. Role of glucose as a modulator of anabolic and catabolic gene expression in normal and osteoarthritic human chondrocytes. *J. Cell Biochem.*, 2011, Vol. 112, no. 10, pp. 2813-2824.
62. Salwa Sokkar, Jehan A. El-Sharnouby, Amal Helmy, Amal El-Bendary, Laila Sayed Ahmad, Kamal Okasha. Role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPAR-γ2) Gene Polymorphism in Type 2 Diabetes Mellitus. *European Journal of General Medicine*, 2009, Vol. 6, no. 2, pp. 78-86.
63. Schett G., Kleyer A., Perricone C., Sahinbegovic E., Iagnocco A., Zwerina J., Lorenzini R., Aschenbrenner F., Berenbaum F., D'Agostino M.A., Willeit J., Kiechl S. Diabetes is an independent predictor for severe osteoarthritis: results from a longitudinal cohort study. *Diabetes Care*, 2013, Vol. 36, no. 2, pp. 403-409.
64. Sellam J., Berenbaum F. Is osteoarthritis a metabolic disease? *Joint Bone Spine*, 2013, Vol. 80, no. 6, pp. 568-573.
65. Solovieva T., Vehmas P., Leino-Arjas A., Hirvonen. Adipose tissue associated genes in hand osteoarthritis in Finnish women. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2014, Vol. 22, p. S237.
66. Stürmer T., Brenner H., Koenig W., Günther K.P. Severity and extent of osteoarthritis and low grade systemic inflammation as assessed by high sensitivity C reactive protein. *Ann Rheum Dis.*, 2004, Vol. 63, no. 2, pp. 200-205.
67. Tawonsawatruk T., Changthong T., Pingsuthiwong S., Trachoo O., Sura T., Wajnavisit W. A genetic association study between growth differentiation factor 5 (GDF 5) polymorphism and knee osteoarthritis in Thai population. *J. Orthop. Surg. Res.*, 2011, no. 6, p. 47.
68. Toncheva A., Remichkova M., Ikonomova K., Dimitrova P., Ivanovska N. Inflammatory response in patients with active and inactive osteoarthritis. *Rheumatol. Int.*, 2009, Vol. 29, no. 10, pp. 1197-1203.
69. Tuomi T., Santoro N., Caprio S., Cai M., Weng J., Groop L. The many faces of diabetes: a disease with increasing heterogeneity. *Lancet.*, 2014, Vol. 383, no. 9922, pp. 1084-1094.
70. Vlad S.C., Neogi T., Aliabadi P., Fontes J.D., Felson D.T. No association between markers of inflammation and osteoarthritis of the hands and knees. *J. Rheumatol.*, 2011, Vol. 38, no. 8, pp. 1665-1670.
71. Weedon M.N., McCarthy M.I., Hitman G., Walker M., Groves C.J., Zeggini E., Rayner N.W., Shields B., Owen K.R., Hattersley A.T. Combining information from common type 2 diabetes risk polymorphisms improves disease prediction. *PLoS Med.*, 2006, Vol. 3, no. 10, p. e374.

72. Wenquan Niu, Yue Qi, Zhijun Wu, Yan Liu, Dingliang Zhu, Wei Jin. A meta-analysis of receptor for advanced glycation end products gene: Four well-evaluated polymorphisms with diabetes mellitus. *Mol. Cell Endocrinol.*, 2012, Vol. 358, no. 1, pp. 9-17.

73. Yajnik C.S., Janipalli C.S., Bhaskar S., Kulkarni S.R., Freathy R.M., Prakash S., Mani K.R., Weedon M.N., Kale S.D., Deshpande J., Krishnaveni G.V., Veena S.R., Fall C.H., McCarthy M.I., Frayling T.M., Hattersley A.T., Chandak G.R. FTO gene variants are strongly associated with type 2 diabetes in South Asian Indians. *Diabetologia*, 2009, Vol. 52, no. 2, pp. 247-252.

74. Zeggini E., Panoutsopoulou K., Southam L., Rayner N.W., Day-Williams A.G., Lopes M.C. Identification of new susceptibility loci for osteoarthritis (arcOGEN): a genome-wide association study. *Lancet.*, 2012, Vol. 380, no. 9844, pp. 815-823.

75. Zheru D., Peiliang F., Yuli W., Haishan W., Qirong Q., Xiaohua L., Hui Z., Bo W., Qiwei F. Association of PPAR γ gene polymorphisms with osteoarthritis in a southeast Chinese population. *J. Genet.*, 2014, Vol. 93, no. 3, pp. 719-723.

Авторы:

Казыгашева Е.В. — младший научный сотрудник 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:

Kazygasheva E.V., Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopharmacology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 19.04.2016
Принята к печати 31.05.2016

Received 19.04.2016
Accepted 31.05.2016

ВЛИЯНИЕ Breg И IL-10 НА ГУМОРАЛЬНЫЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ

Гаврилова М.В., Снегирева Н.А., Сидорова Е.В.

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

Резюме. Breg угнетают патологические процессы при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях. Регуляторные функции Breg обусловлены в основном секрецией IL-10. Роль Breg в гуморальном иммунном ответе не изучалась. В данной работе было исследовано влияние IL-10 и Breg при иммунном ответе В1- и В2-клеток мыши на Т-зависимые и Т-независимые антигены в модельной системе *in vitro*. В качестве Т-зависимого антигена использовали водорастворимый антиген бараньих эритроцитов, Т-независимого антигена 1 типа — LPS, Т-независимых антигенов 2 типа поливинилпирролидон и $\alpha(1\rightarrow3)$ декстран. В1- и В2-лимфоциты были выделены из клеток перитонеальной полости и селезенки мышей линии СВА соответственно. Клетки культивировались в среде RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками с антигенами, IL-10 и без них. Число антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток определяли методом ELISPOT.

Под действием водорастворимого антигена бараньих эритроцитов число антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток в культурах В1- и В2-лимфоцитов возрастало. Добавление IL-10 приводило к снижению числа антителопродуцентов в среднем на 27%. IL-10 снижал также число индуцированных LPS антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток в культуре В2-лимфоцитов на 75%. Под действием IL-10 в культуре В1-клеток, активированных Т-независимыми антигенами 2 типа, число антителопродуцентов уменьшалось в среднем на 50%.

Для изучения функциональной активности Breg выделяли из клеток перитонеальной полости и селезенки мышей линии СВА. Количество Breg после активации В-клеток LPS, иономицином и форболовым эфиром возрастало в 20 раз (с 4 до 96%). Основным изотипом иммуноглобулинов, секретируемых Breg, являлся IgM. При чистоте Breg 96% иммуноглобулины секретируют ~12% этих клеток. Это означает, что некоторая часть Breg одновременно синтезирует иммуноглобулины и IL-10.

Получение высокоочищенных Breg и использование трансвеллов позволило исследовать бесконтактное влияние Breg на иммунный ответ в культуре спленоцитов хид-мышей линии СВА/Н. Было установлено, что как специфический, так и поликлональный ответ в культуре этих клеток на водорастворимый антиген бараньих эритроцитов Breg угнетали. Таким образом, Breg участвуют в гуморальном иммунном ответе, подавляя функциональную активность спленоцитов мышей линии СВА/Н на Т-зависимый антиген. Очевидно, что существенную роль в этом играет секретируемый Breg IL-10.

Ключевые слова: Breg, IL-10, индукция иммунного ответа *in vitro*, антителопродуценты, антигены, В1-лимфоциты

Адрес для переписки:

Гаврилова Марина Викторовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»
115533, Россия, Москва, Нагатинская наб., 18, кв. 90.
Тел.: 8 (499) 618-49-93; (495) 674-08-42.
E-mail: gavrilovamv@gmail.com

Address for correspondence:

Gavrilova Marina V.
I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera
115533, Russian Federation, Moscow,
Nagatinskaya emb., 18, apt 90.
Phone: 7 (499) 618-49-93; (495) 674-08-42.
E-mail: gavrilovamv@gmail.com

Образец цитирования:

М.В. Гаврилова, Н.А. Снегирева, Е.В. Сидорова
«Влияние Breg и IL-10 на гуморальный иммунный ответ»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 331–338.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-331-338

© Гаврилова М.В. и соавт., 2016

For citation:

M.V. Gavrilova, N.A. Snegireva, E.V. Sidorova “Influence of Breg and IL-10 upon humoral immune response”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 331–338. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-331-338

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-331-338>

INFLUENCE OF Breg AND IL-10 UPON HUMORAL IMMUNE RESPONSE

Gavrilova M.V., Snegireva N.A., Sidorova E.V.

I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Abstract. B regulatory cells (Bregs) are shown to downregulate autoimmune and inflammation processes. Their modifying effects depend on IL-10 secretion. A role of Bregs in development of humoral immune response was not investigated. Influence of Bregs and IL-10 upon *in vitro* response of murine B1 and B2 cells to T-dependent and T-independent antigens was studied in a model system. A water-soluble sheep erythrocyte antigen was used as a T-dependent antigen, whereas LPS was applied as a type 1 T-independent antigen, and polyvinylpyrrolidone and alpha(1→3)dextran were added as type 2 T-independent antigens. B1 and B2 lymphocytes were isolated from, respectively, peritoneal cavity and spleen of CBA mice. The cells were cultured in RPMI1640 medium with 10% of FCS supplemented with appropriate antigens and IL-10. The numbers of antibody- and total Ig-forming cells were determined by ELISPOT method.

The erythrocyte antigen induced an increase of antibody- and total Ig-forming cell numbers in cultured B1 and B2 cell populations. IL-10 addition caused reduction of antibody- and total Ig-forming cells by 27%. Similarly, IL-10 caused a drop in antibody- and total Ig-forming cells in LPS-stimulated B2 cell cultures by 75%, as well as 50 per cent decrease in numbers of antibody-forming cells in B-1 cell cultures when induced by the type 2 T-independent antigens.

To assess functional activity of Bregs, the cells were isolated from peritoneal cavity and spleen of CBA mice. Total yields of Bregs were 20-fold increased upon activation of B cells with LPS, ionomycin and phorbol ester (from 4% to 96%). IgM was the main immunoglobulin isotype secreted by the Bregs. 96% of activated Bregs produced IL-10. About 12% of the cells were shown to produce immunoglobulins. This finding suggests that some of Bregs synthesize both IL-10 and immunoglobulins.

To study distant effect of Bregs upon immune response, the splenocyte culture of xid CBA/N mice were tested in Transwells with enriched Bregs. It was revealed that the Bregs caused inhibition of both specific and polyclonal immune response to the water-soluble sheep erythrocyte antigen. Hence, Bregs are shown to participate in humoral immune response, probably, by suppressing functional activity of splenocytes from CBA/N mice to T-dependent antigen. IL-10 secreted by Bregs may play a sufficient role in these regulatory effects.

Keywords: Bregs, IL-10, *in vitro* immune response induction, antibody producers, antigens, B1-lymphocytes

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (№ 14-04-00512 А).

Введение

Основной функцией В-лимфоцитов является образование антител (АТ). Наряду с этим В-клетки участвуют в презентации антигенов (АГ), фагоцитозе, органогенезе лимфоидных органов и секреции цитокинов. В последние годы выяснилось, что В-клетки, как и Т-лимфоциты, обладают еще и регуляторными функциями.

Впервые регуляторные функции В-клеток были обнаружены Janeway С.А. et al. [12]. На модели экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у мышей было показано, что В-клетки участвуют в подавлении острого аутоиммунного процесса. Позднее было установлено, что выздоровление мышей обеспечивается продуцируемым регуляторными В-клетками (Breg) IL-10 [5].

Существует ряд обладающих регуляторными функциями популяций В-клеток: Breg, Br1 и Br3.

Эти субпопуляции появляются при разных формах воспалительных и аутоиммунных процессов и отличаются по фенотипу [9]. Классификация Breg проведена по аналогии с классификацией Treg. Следует подчеркнуть, что ясности в этом вопросе пока нет.

Как уже говорилось, регуляторные функции Breg обусловлены в основном IL-10. Главным источником IL-10 являются Breg селезенки и брюшной полости. Они обладают уникальным фенотипом — CD1d^{hi}CD5⁺CD19^{hi} и продуцируют исключительно IL-10. Эту субпопуляцию регуляторных В-клеток предложено обозначать B10 [4].

Иммунорегуляторные свойства IL-10 обусловлены его способностью угнетать презентацию АГ, продукцию провоспалительных цитокинов, пролиферацию Т-лимфоцитов и функции некоторых других клеток [2, 4]. Влияние IL-10 на гуморальный иммунный ответ изучено недостаточно.

Вместе с тем изучение свойств и функций Breg является одной из первоочередных задач современной иммунологии и медицины. Вопросы в этой области значительно больше, чем

ответов. Так до сих пор не установлено, есть ли Breg в норме или они возникают под влиянием патологических или антигенных стимулов. Каков механизм их возникновения? Каково их происхождение? Являются ли они новой субпопуляцией В-лимфоцитов или возникают из В1- или В2-клеток? Обладают ли Breg АГ специфичностью? Неизвестно, как влияет IL-10 на ответ разных субпопуляций В-клеток на Т-зависимые и Т-независимые АГ (ТЗ и ТН АГ соответственно). Не разработаны и экспериментальные модели, позволяющие непосредственно изучать сами эти клетки.

Ранее нами была разработана модельная система, позволяющая использовать относительно небольшие количества В1-лимфоцитов для изучения их взаимодействий с другими клетками *in vitro* [3]. В настоящей работе такая модельная система использовалась для изучения влияния IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-клеток мыши на ТЗ АГ и ТН АГ 1-го и 2-го типов (ТН-1 и ТН-2 АГ соответственно) и функциональной активности Breg, выделенных из брюшной полости и селезенки мышей СВА.

Материалы и методы

Животные и антигены

В опытах использовали самок мышей линии СВА весом 16–18 г, полученных из питомника «Андреевка», и хид-мышей линии СВА/N, любезно предоставленных д-ром Т.К. Кондратьевой (ФГБНУ «ЦНИИТ», Москва) и поддерживаемых в виварии ФГБНУ «НИИВС им. И.И. Мечникова».

В качестве ТЗ АГ использовали водорастворимый антиген бараньих эритроцитов (ВРА-БЭ) [11], ТН-1 АГ липополисахарид *Escherichia coli* серотип 0111: В4 (LPS) (Sigma), ТН-2 АГ — $\alpha(1\rightarrow3)$ декстран *L. mesenteroides* (Декс) и поливинилпирролидон 350 кДа (ПВП) (Sigma). ТЗ АГ вносили в культуры клеток в дозе 25 мкг/мл, ТН-1 АГ — 1 нг/мл и ТН-2 АГ — 10 нг/мл.

Клеточные субпопуляции

Для выделения В-клеточных субпопуляций использовали мышей линии СВА. В1-лимфоциты выделяли из клеток перитонеальной полости [1], В2-лимфоциты — из селезенки с использованием магнитных бус Dynabeads Mouse CD43 (Dyna, Норвегия). Breg выделяли из селезенки и перитонеальной полости мышей линии СВА с использованием Regulatory B cell isolation kit, согласно инструкции фирмы-производителя (Miltenyi Biotec). Вкратце: из клеток селезенки или перитонеальной полости выделяли тотальные В-лимфоциты с помощью иммуномагнитной сепарации. В-клетки (2,5 млн/мл) активировали 10 мкг/мл LPS 18–20 часов *in vitro*

в CO₂ инкубаторе при 37 °С. Затем к клеткам добавляли форбол-12-мириостат-13-ацетат (РМА) 50 нг/мл и иономицин 500 нг/мл и продолжали инкубацию еще 5 часов. Активированные клетки вначале обрабатывали В cell catch reagent, а затем анти-IL-10 АТ, меченными фикоэритрином (РЕ). На заключительном этапе Breg выделяли при помощи магнитных бус, покрытых анти-РЕ АТ. В качестве контроля использовали В-клетки селезенки и перитонеальной полости, прошедшие все стадии получения Breg, за исключением добавления активаторов.

Проточная цитометрия

Фенотип и чистоту выделяемых В1- и В2-клеточных субпопуляций определяли методом проточной цитометрии. Использовали АТ к CD23 (В3В4) и CD3 (17А2), меченные FITC, АТ к CD19 (1D3) и CD5 (53-7.3), меченные РЕ, и АТ к В220 (RA3-6В2), меченные РЕ-Cy5 (BD Pharmingen). Для блокировки Fc-рецепторов использовали АТ к CD16/CD32 (2.4G2) (BD Pharmingen).

Breg в культурах активированных и неактивированных перитонеальных клеток выявляли с помощью АТ к CD19 (1D3), меченных FITC (eBioscience) и АТ к IL-10, меченных РЕ (Miltenyi Biotec). Кроме того, Breg были окрашены АТ к CD5 (53-7.3), CD43 (S7), CD138 (281-2), CD1d (1B1), меченных РЕ (BD Pharmingen и eBioscience); АТ к CD11b (M1/70), CD23 (В3В4), меченных FITC (BD Pharmingen) и АТ к CD86 (RMMP-2), меченных РЕ (Caltag). Для определения мертвых клеток использовали пропидий йодид (Sigma). Проточную цитометрию проводили на Beckman Coulter EPICS XL; результаты анализировали с помощью SYSTEM II (Beckman COULTER, USA).

Культивирование клеток

Для создания необходимой плотности клеток в качестве «филлеров» использовали спленоциты мышей СВА/N.

Для изучения влияния IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-клетки смешивали со спленоцитами мышей СВА/N в соотношении 1:10 и культивировали в полной среде RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками в плоскодонных 96- и 24-луночных планшетах (Nunc, Дания) в CO₂-инкубаторе при 37 °С в течение 4-х дней в присутствии АГ, АГ и IL-10 (50 нг/мл) или без них.

Для отдельного культивирования Breg со спленоцитами мышей СВА/N использовали 24-луночные плоскодонные планшеты (Nunc) с мембранными вставками Millicell (Millipore, США). В лунки вносили по 5×10^6 спленоцитов, а в мембранные вставки — по 1×10^6 Breg, после чего культивировали клетки в среде RPMI 1640 с 10% ЭТС и всеми необходимыми добавками.

Определение антитело- и иммуноглобулин-образующих клеток

Функциональную активность В-лимфоцитов оценивали по числу АТ- и иммуноглобулин-образующих клеток (АОК и ИГОК соответственно) в культурах с ТЗ и ТН-1 АГ и без них с помощью клеточного иммуноферментного анализа (ELISPOT). Для определения АОК фильтры сенсibiliзировали АГ и вносили по 100×10^3 клеток/лунку; для выявления ИГОК фильтры покрывали козьими АТ к иммуноглобулинам мыши (Invitrogen) и вносили в лунки по 10×10^3 клеток. Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с 1% ЭТС в течение 12-18 часов в CO_2 -инкубаторе. После культивирования клетки из лунок удаляли и обрабатывали фильтры биотинилированными АТ к IgM мыши (Invitrogen) и стрептовидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Invitrogen). По окончании инкубации подсчитывали число АОК и ИГОК на фильтрах и пересчитывали их на 10^6 живых клеток [1].

Статистическая обработка результатов

Результаты экспериментов представлены в виде средних арифметических значений со стандартными отклонениями ($M \pm S$). Достоверность различий результатов между группами нормальных и иммунизированных животных исследовали при помощи дисперсионного анализа. Различия рассматривались как значимые при $p < 0,05$.

Результаты

Влияние IL-10 на иммунный ответ на ТЗ-АГ

IL-10 продуцируется Breg с фенотипическими характеристиками как В1-, так и В2-лимфоцитов [8]. Изучение его действия на сами эти клетки не проводилось. На первом этапе было исследовано влияние IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-клеток на ТЗ АГ – ВРАБЭ. Как и ожи-

далось, внесение ВРАБЭ в культуру клеток селезенки мышей линии СВА/N, а также в культуры, содержащие смеси этих клеток с В1- или В2-лимфоцитами мышей линии СВА, индуцировало иммунный ответ. В культурах спленоцитов число АОК и ИГОК возрастало (рис. 1А, Б). Одновременное внесение в культуры клеток ВРАБЭ и IL-10 (50 нг/мл) в большинстве случаев приводило к снижению количества АОК и ИГОК. Так, в культуре спленоцитов мышей линии СВА/N число АОК уменьшалось на 80%, а число ИГОК – на 50%. В смешанных культурах, содержащих В1- или В2-лимфоциты, количество АОК снижалось на 25 и 28%; а число ИГОК – на 33 и 23% соответственно. Таким образом, при ответе В1- и В2-клеток на ТЗ АГ IL-10 оказывал угнетающее действие. На жизнеспособность клеток в культурах добавление IL-10 практически не влияло.

Влияние IL-10 на иммунный ответ на ТН-1 АГ

На следующем этапе исследовали иммунный ответ В-лимфоцитов на ТН-1 АГ – LPS. Поскольку В1-клетки конститутивно синтезируют IL-10, количество которого под действием LPS увеличивается [2], и разграничить действие вносимого и эндогенного IL-10 сложно, в опытах использовали только В2-клетки. Как видно из рисунка 2, внесение LPS в культуры клеток приводило к образованию АОК и увеличению числа ИГОК. Добавление IL-10, как и при ответе на ТЗ АГ, снижало количество АОК и ИГОК. В культуре спленоцитов хид-мышей число АОК и ИГОК, индуцированных LPS, снижалось на 65 и 86%, а в смешанной культуре, содержащей В2-клетки мышей линии СВА, – на 73 и 76% соответственно. Полученные данные свидетельствуют о том, что на иммунный ответ В2-лимфоцитов на LPS IL-10 оказывал угнетающее действие.

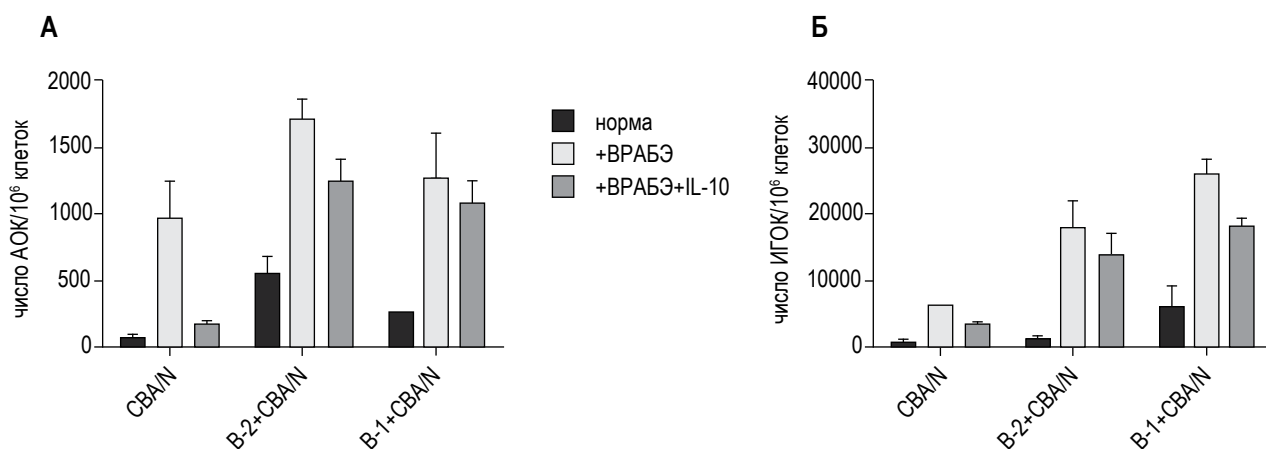


Рисунок 1. Влияние IL-10 на иммунный ответ В1- и В2-лимфоцитов на ВРАБЭ в модельной системе *in vitro*: число АОК (А), число ИГОК (Б)

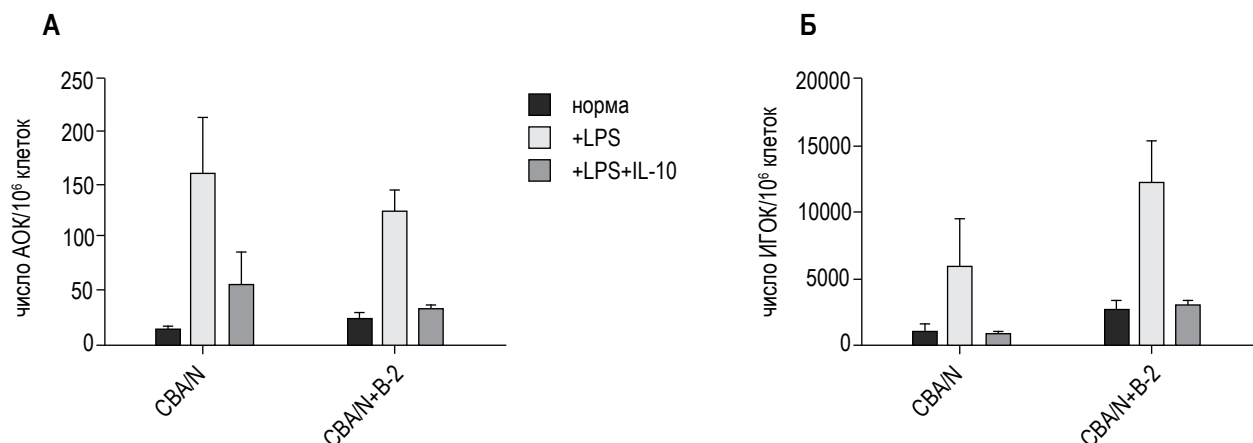


Рисунок 2. Влияние IL-10 на иммунный ответ на LPS в модельной системе *in vitro*: число АОК (А), число ИГОК (Б)

Влияние IL-10 на иммунный ответ на ТН-2 АГ

Иммунный ответ на ТН-2 АГ и влияние на него IL-10 исследовали в модельной системе, содержащей В1-лимфоциты мышей линии СВА.

Внесение ПВП (10 нг/мл) в культуру с В1-лимфоцитами индуцировало специфический и поликлональный иммунный ответ: число АОК возрастало примерно на 47%, а число ИГОК на 45%. Добавление IL-10 в культуры с ПВП снижало количества АОК и ИГОК ~ на 46 и 70% соответственно. Таким образом, IL-10 угнетал как специфический, так и поликлональный иммунный ответ В1-лимфоцитов на ПВП.

Внесение Декс (10 нг/мл) в культуру с В1-лимфоцитами также индуцировало специфический иммунный ответ: число АОК возрастало с $118 \pm 10/10^6$ до $251 \pm 30/10^6$ клеток. Число ИГОК под действием Декс возрастало не более чем на 20%. Внесение IL-10 снижало число АОК к Декс на 61%. На количество ИГОК добавление IL-10 в культуру практически не влияло.

Фенотип и функциональная активность Breg

Для изучения функциональной активности Breg и взаимодействия их с другими клетками необходимо выделять Breg в чистом виде. Для вы-

деления Breg использовали Regulatory B cell isolation kit (Miltenyi Biotec). К Breg при этом относили все В-клетки, продуцирующие IL-10. В В-лимфоцитах, выделенных из активированных клеток перитонеальной полости и селезенки мышей линии СВА, содержалось около 96% и 70% В-клеток, синтезирующих IL-10 соответственно; для неактивированных клеток этот показатель равнялся ~ 4% (рис. 3).

Для более детальной характеристики Breg определяли некоторые поверхностные маркеры активированных и контрольных (неактивированных) перитонеальных Breg. Breg, выделенные после активации, несли на своей поверхности CD5 – $42 \pm 1,4\%$; CD43 – $75 \pm 9\%$; CD11b – $59 \pm 1,4\%$; CD80 – $7 \pm 6\%$; CD86 – $66 \pm 14\%$; CD138 – $9,4 \pm 0,3\%$; CD1d – $86 \pm 11\%$; CD23 – $30 \pm 2\%$. Контрольные (неактивированные) Breg несли те же маркеры, однако количество клеток, экспрессирующих маркер CD86, не превышало $10 \pm 7\%$.

Принципиальный интерес представляет вопрос о том, продуцируют ли Breg одновременно АТ/ИГ (иммуноглобулины) и IL-10. Для решения этого вопроса мы исследовали образование ИГ выделенными Breg. В культурах контрольных

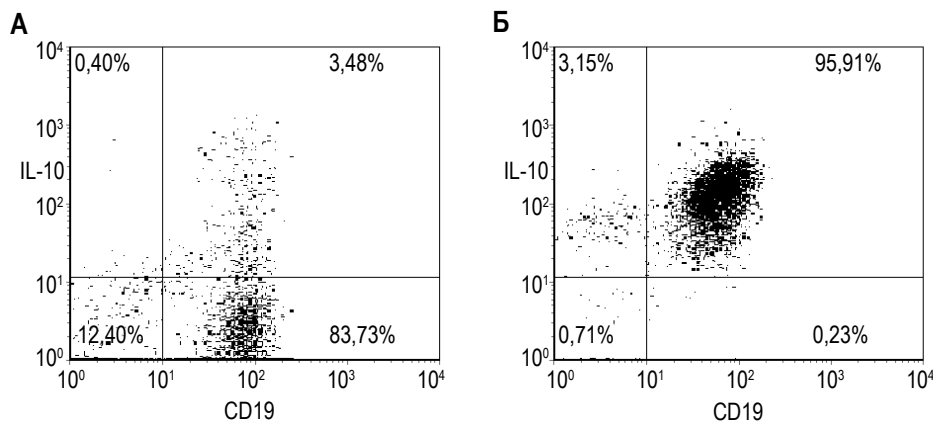


Рисунок 3. Breg, выделенные из культуры неактивированных (А) и активированных (Б) перитонеальных В-лимфоцитов мышей линии СВА

Breg содержалось 13359 ± 2295 IgM-продуцентов на млн клеток. В культурах активированных Breg выявлялось 125687 ± 23279 IgM-продуцентов на млн клеток, что составляло 12%, т.е. наблюдалось их увеличение в 9 раз. Наряду с этим возрастали количества IgG и IgA продуцентов (не менее чем в 2 раза). Чистота субпопуляции активированных Breg при этом равнялась 96%. Это позволяет заключить, что не менее 8% Breg одновременно синтезируют и ИГ и IL-10.

Влияние Breg на иммунный ответ на ВРАБЭ

Выделение Breg высокой чистоты позволило перейти к изучению влияния на гуморальный иммунный ответ самих этих клеток. В качестве модели был выбран ответ спленоцитов мышей линии СВА/N, содержащих фактически только В2-клетки. Поскольку Breg сами синтезируют большое количество ИГ, использовали раздельное культивирование Breg и спленоцитов мышей линии СВА/N (в трансвеллах). Спленоциты мышей СВА/N помещали в нижнюю, а Breg в верхнюю камеру. Клетки культивировали в течение 4-х суток в присутствии и в отсутствие ВРАБЭ и определяли содержание АОК и ИГОК в культурах. В качестве контроля использовали перитонеальные В-клетки мышей СВА, помещенные в верхнюю камеру, прошедшие все стадии получения Breg, за исключением добавления активаторов (контрольные В-клетки, Вконтр).

Полученные данные представлены на рисунке 4. Как видно из рисунка, внесение в верхнюю камеру контрольных В-лимфоцитов приводило к увеличению прироста числа АОК к ВРАБЭ в суспензии спленоцитов мышей линии СВА/N в 2 раза. На число ИГОК контрольные В-лимфоциты влияли незначительно. Напротив, культивирова-

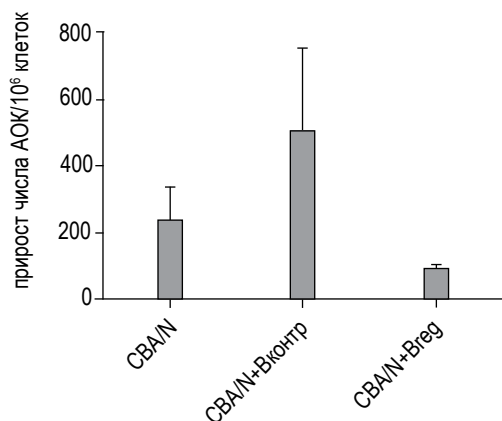
ние Breg (верхняя камера) со спленоцитами мышей линии СВА/N приводило к снижению прироста числа АОК к ВРАБЭ ~ в 2,5 раза и ИГОК ~ в 5,6 раз. Таким образом, Breg угнетали специфический и поликлональный иммунный ответ на ВРАБЭ.

Обсуждение

В-клетки, обладающие регуляторными функциями, обнаруживаются при ряде воспалительных и аутоиммунных заболеваний [8], где их роль сводится в основном (хотя и не всегда) к угнетению патологических процессов. Роль Breg в гуморальном иммунитете практически не исследована. Строго говоря, вообще неизвестно, играют ли они в нем какую-либо роль.

Поскольку Breg экспрессируют маркер В-1а лимфоцитов CD5, можно предположить, что они представляют особую субпопуляцию В1-клеток, участвующих во врожденном иммунитете и регулирующих ответы на Т-независимые (ТН) бактериальные АГ. Косвенным указанием на это служит резкое увеличение количества Breg под влиянием LPS [7]. Исходя из этого, мы предположили, что наиболее удобной моделью для выявления роли Breg в гуморальном ответе является модель ответа на ТН АГ 1-го и 2-го типов. Поскольку регуляторная роль Breg в основном обусловлена выделяемым ими IL-10, в первую очередь следовало выяснить, влияет ли IL-10 на функциональную активность В1- и В2-клеток при ответе на ТН АГ и ТЗ АГ. Очевидно, что такого рода исследования удобно проводить в опытах *in vitro*.

А



Б

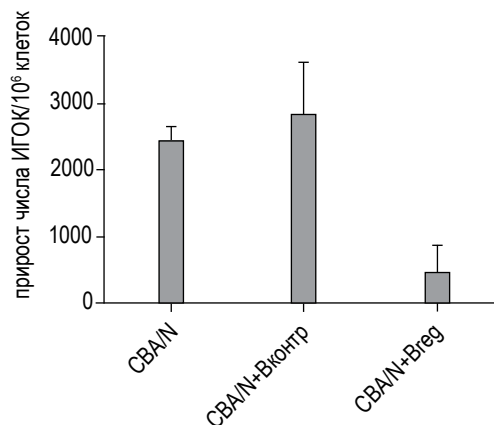


Рисунок 4. Влияние Breg на иммунный ответ на ВРАБЭ в культуре спленоцитов мышей линии СВА/N: прирост числа АОК (А), прирост числа ИГОК (Б)

Примечание. Прирост количеств АОК и ИГОК, индуцированный при внесении ВРАБЭ, рассчитывали как разность между их значениями в иммунных и нормальных культурах спленоцитов.

Ранее нами была разработана модельная система, в которой для создания оптимальной клеточной плотности в культурах используются спленоциты хид-мышей линии СВА/Н, не имеющих В1-клеток [3]. Это позволяет исследовать функциональную активность В1- и В2-лимфоцитов мышей конгенной линии СВА, определяя количество АОК и ИГОК, образуемых внесенными в культуры В1- и В2-клетками. Эта модельная система была использована в настоящих опытах.

Полученные в опытах с IL-10 данные свидетельствуют о том, что IL-10 угнетает образование АОК и ИГОК на ТЗ АГ, как в культурах спленоцитов мышей линии СВА/Н, так и в смешанных культурах, содержащих В1- и В2-клетки мышей линии СВА. Жизнеспособность клеток под действием IL-10 не снижалась. Это говорит о том, что угнетение ответа не обусловлено гибелью клеток. Сильнее всего снижалось образование АОК и ИГОК в культурах спленоцитов мышей линии СВА/Н: на 80% и 50% для АОК и ИГОК соответственно. Поскольку в таких культурах присутствуют только В2-клетки, очевидно, что снижение числа АОК и ИГОК, индуцированных ТЗ АГ, связано с действием IL-10 на В2-лимфоциты.

Эти результаты противоречат данным, полученным группой Mond J.J. [10], не выявившим угнетения ТЗ-ответа под влиянием IL-10. Различие скорее всего обусловлено тем, что группой Mond J.J. использовались тотальные В-клетки селезенки, а не В1- и В2-лимфоциты; кроме того, существенно различались и условия постановки опытов (авторы использовали сложную систему иммунного ответа *in vitro*, включающую наличие IL-5). В то же время данные опытов с субпопуляциями В-клеток подтвердили полученные ранее на тотальных В-спленоцитах результаты о влиянии IL-10 на иммунный ответ на ТН АГ [10].

Выявление влияния IL-10 на гуморальный ответ поставило вопрос о свойствах и функциональной активности самих Breg. В первую очередь следует понять, как возникают Breg. Можно ли любую В клетку «превратить» в Breg (продуцент IL-10), активируя ее тем или иным способом, или в Breg превращаются только клетки, принадлежащие к особой субпопуляции В-лимфоцитов? В наших опытах число В-клеток, экспрессирующих маркер CD86, после активации повышалось примерно в 7 раз (с 10 до 66%); количества В-клеток, секретирующих IL-10, после активации возрастало более чем в 20 раз (с 4 до 96%). Эти данные могут свидетельствовать в пользу возможности превращения любой В-клетки в Breg. Однако, используемый способ активации не физиологичен, а применяемые нами для идентификации Breg критерии, безусловно, недостаточны для того, чтобы счи-

тать все активированные или секретирующие IL-10 клетки Breg. Более вероятно, что истинные Breg представляют лишь незначительную часть субпопуляции В-лимфоцитов, возникающую или активирующуюся под влиянием различных стимулов. Принципиально важен при этом вопрос о роли и специфичности BCR. Вопрос нуждается в дальнейшем исследовании.

В связи с этим возникает следующий вопрос: синтезируют ли ИГ сами Breg и, если синтезируют, как это сочетается со способностью IL-10 угнетать их синтез? Наиболее простым являлось предположение о том, что ИГ и IL-10 секретируются разными клетками. Разработка способа выделения Breg позволила определить в них число ИГ-продуцентов. Оказалось, что при чистоте Breg 96% ИГ синтезируют не менее 12% этих клеток. Основным изотипом секретируемых ИГ является IgM. Если даже появление ИГОК обусловлено примесью остальных клеток (~4%), все равно остаются 8% Breg, одновременно продуцирующих ИГ и IL-10. Этот вывод, однако, не бесспорен, т.к. не показано, что ИГ-продуценты, отобранные по способности секретировать IL-10, продолжали его секретировать в момент определения синтеза ИГ. Не исключено, что эти процессы разделены во времени. Действительно, было показано, что регуляторные функции и синтез АГ Breg наблюдаются «со сдвигом по фазе» [6].

Изучая влияние IL-10 на гуморальный иммунный ответ, мы использовали дозу цитокина, существенно превышающую физиологическую. Очевидно, что значительно интереснее исследовать реальное взаимодействие Breg с ИГ-образующими клетками. Получение высокоочищенных Breg и использование трансвеллов позволило исследовать бесконтактное влияние Breg на специфический и поликлональный ответ на ВРАБЭ спленоцитов мышей линии СВА/Н, содержащих фактически только В2-популяцию лимфоцитов. В этих опытах выявились явные различия в действии Вконтр и Breg, помещаемых в верхнюю камеру, на ответ спленоцитов мышей линии СВА/Н, вносимых вместе с АГ в нижнюю камеру. Вконтр повышали специфический (~ в 2 раза), мало влияя на поликлональный ответ на ВРАБЭ. Напротив, Breg угнетали как специфический, так и поликлональный ответ спленоцитов мышей линии СВА/Н на ВРАБЭ.

Необходимо отметить, что не только «верхние» клетки влияют на «нижние», но и клетки, помещенные в верхнюю камеру, также могут отвечать и на АГ и на факторы, выделяемые клетками нижней камеры. Вопрос нуждается в отдельном исследовании.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что Breg участвуют в гуморальном

иммунном ответе, подавляя функциональную активность спленоцитов мышей линии СВА/Н на ВРАБЭ. Очевидно, что существенную роль в этом играет секретируемый Breg IL-10.

Выводы

1. IL-10 угнетает специфический и поликлональный ответ В1- и В2-клеток мыши на Т-зависимый и Т-независимые антигены в системе *in vitro*.

2. Breg, секретирующие IL-10, могут одновременно продуцировать иммуноглобулины, основная часть которых относится к изотипу IgM.

3. Breg при отдельном культивировании подавляют иммунный ответ на ВРАБЭ спленоцитов мышей линии СВА/Н *in vitro*.

Благодарности

С прискорбием сообщаем, что доктор биологических наук Екатерина Владимировна Сидорова скончалась 31 марта 2016 г. Она была бессменной заведующей лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов и данная работа была выполнена под ее непосредственным руководством.

Авторы благодарят И.Н. Чернышову за обсуждение и помощь при написании статьи.

Список литературы / References

1. Гаврилова М.В., Чернышова И.Н., Хоченков Д.А., Сидорова Е.В. Клеточные взаимодействия при ответе на Т-независимые антигены 2-го типа *in vitro* // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 4. С. 325-334. [Gavrilova M.V., Chernyshova I.N., Khochenkov D.A., Sidorova E.V. *In vitro* cellular interactions during immune response to T cellindependent type 2 antigens. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, Vol. 5, no. 4, pp. 325-334. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2013-4-325-334>
2. Bouaziz J.D., Yanaba K., Tedder T.F. Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. *Immunol. Rev.*, 2008, Vol. 224, pp. 201-214.
3. Chernyshova I.N., Gavrilova M.V., Sidorova E.V. Model System for Studies of Cell Interactions and Mechanisms of Immune Response to T-Independent Antigens of Type 2 *in vitro*. *Biochemistry (Moscow) Supplement Series A: Membrane and Cell Biology*, 2010, Vol. 4, no. 4, pp. 321-326.
4. DiLillo D.J., Horikawa M., Tedder T.F. B-lymphocyte effector functions in health and disease. *Immunol. Res.*, 2011, Vol. 49, no. 1-3, pp. 281-292.
5. Fillatreau S., Sweeney C.H., McGeachy M.J., Gray D., Anderton S.M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.*, 2002, Vol. 3, no. 10, pp. 944-950.
6. Maseda D., Smith S.H., DiLillo D.J., Bryant J.M., Candando K.M., Weaver C.T., Tedder T.F. Regulatory B10 cells differentiate into antibody-secreting cells after transient IL-10 production *in vivo*. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 8, pp. 1036-1048.
7. Matsushita T., Tedder T.F. Identifying regulatory B cells (B10 cells) that produce IL-10 in mice. *Methods Mol. Biol.*, 2011, Vol. 677, pp. 99-111.
8. Mauri C., Bosma A. Immune regulatory function of B cells. *Annu Rev Immunol.* 2012, Vol. 30, pp. 221-241.
9. Noh G., Lee J.H. Regulatory B cells and allergic diseases. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2011, Vol. 3, no. 3, pp. 168-177.
10. Pecanha L.M.T., Snapper C.M., Lees A., Yamaguchi H., Mond J.J. IL-10 inhibits T cell-independent but not T cell-dependent responses *in vitro*. *J. Immunol.*, 1993, Vol. 150, no. 8, pp. 3215-3223.
11. Seman M., Mazie J.C., Bussard A.E. Antigen properties of water soluble fraction of sheep erythrocytes. *Eur. J. Immunol.*, 1972, Vol. 2, no. 4, pp. 387-388.
12. Wolf S.D., Dittel B.N., Hardardottir F., Janeway C.A. Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 184, no. 6, pp. 2271-2278.

Авторы:

Гаврилова М.В. — научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Снегирева Н.А. — научный сотрудник лаборатории биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Сидорова Е.В. — д.б.н., профессор, заведующая лабораторией биосинтеза иммуноглобулинов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

Authors:

Gavrilova M.V., Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Snegireva N.A., Research Associate, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Sidorova E.V., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Laboratory of Immunoglobulin Biosynthesis, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, Russian Federation

Поступила 02.06.2016
Принята к печати 20.06.2016

Received 02.06.2016
Accepted 20.06.2016

ИЗМЕНЕНИЯ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *Glut1*, *mTOR* И *AMPK1 α* ЛИМФОЦИТАМИ ПАНКРЕАТИЧЕСКИХ ЛИМФАТИЧЕСКИХ УЗЛОВ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ

Путилин Д.А., Камышный А.М.

Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Резюме. С помощью молекулярно-генетических методов исследовали уровень экспрессии мРНК генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1 α* в ПЛУ крыс с экспериментальным стрептозототин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) и после введений метформина. Для определения уровня мРНК исследуемых генов проводили ОТ-ПЦР в реальном времени на амплификаторе CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems ("Bio-Rad Laboratories, Inc.", США). Иммунопозитивные *mTOR*⁺ лимфоциты были идентифицированы с помощью метода непрямой иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител. Установлено, что гипергликемия вызывала транскрипционную индукцию генов транспортеров глюкозы *Glut1* (в 9,9-28,9 раз, $p < 0,05$) и протеинкиназы *mTOR* (в 5,3-3,3 раза, $p < 0,05$) в клетках ПЛУ. Развитие диабета также сопровождалось увеличением общего числа *mTOR*⁺ клеток в ПЛУ на 5 неделе патологического процесса на 24-34% ($p < 0,05$) и концентрации мишени рапамицина в иммунопозитивных клетках. Введения метформина диабетическим крысам приводили к увеличению уровня мРНК гена *AMPK1 α* на 87% ($p < 0,05$) на 3 неделе и в 38 раз ($p < 0,05$) на 5 неделе развития ЭСИСД и угнетению экспрессии *mTOR* в ПЛУ (в 3-14,7 раз, $p < 0,05$), сопровождаясь снижением на 40% ($p < 0,05$) суммарной плотности *mTOR*⁺ клеток в мягкотных тяжах ПЛУ у животных с 5-ти недельным ЭСИСД.

Ключевые слова: стрептозототин-индуцированный сахарный диабет, панкреатические лимфатические узлы, *Glut1*, *mTOR*, *AMPK1 α* , экспрессия генов

CHANGES OF *Glut1*, *mTOR* AND *AMPK1 α* GENE EXPRESSION IN PANCREATIC LYMPH NODE LYMPHOCYTES OF RATS WITH EXPERIMENTAL DIABETES MELLITUS

Putilin D.A., Kamyshnyi A.M.

Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Abstract. With the help of molecular genetic method we have investigated the level of mRNA gene expressions *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1 α* in PLN in pancreatic lymph nodes (PLN) of rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus (SIDM) and after administration of metformin. The levels of *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1 α* mRNA were determined by means of RT-PCR using CFX96™ thermocycler (Real-Time PCR Detection

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Kamysnyi Aleksandr M.
Zaporozhye State Medical University
69035, Ukraine, Zaporozhye, Mayakovsky ave, 26.
Phone: +38 (061) 234-26-31.
E-mail: alexkamyshnyi@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.А. Путилин, А.М. Камышный «Изменения уровня экспрессии генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1* лимфоцитами панкреатических лимфатических узлов крыс при экспериментальном сахарном диабете» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 339-346.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-339-346

© Путилин Д.А., Камышный А.М., 2016

For citation:

D.A. Putilin, A.M. Kamysnyi "Changes of *Glut1*, *mTOR* and *AMPK1* gene expression in pancreatic lymph node lymphocytes of rats with experimental diabetes mellitus", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 339-346. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-339-346

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-339-346>

Systems, Bio-Rad, USA). Relative gene expression levels were calculated as ratios to *GAPDH* reference gene using Ct method. Statistical analysis was performed with available "Bio-Rad CFX Manager 3.1" software (Bio-Rad, USA). The mTOR⁺ positive lymphocytes were identified by means of monoclonal antibodies, using an indirect immunofluorescence method. Hyperglycemia was accompanied by transcriptional induction of glucose transporter *Glut1* gene (9.9 to 28.9-fold, $p < 0.05$), and *mTOR* protein kinase gene (5.3 to 3.3-fold, $p < 0.05$) in PLN. Development of diabetes was also associated with increase by 24-34% in total mTOR⁺ cell numbers in PLN at the 5th week of developing diabetes ($p < 0.05$) and increased concentrations of rapamycin target in the immunopositive cells. Metformin administration to diabetic rats was followed by increased *AMPK1 α* mRNA level of by 87% ($p < 0.05$) at the 3rd week, and 38-fold ($p < 0.05$), at the 5th week of SIDM development and inhibition of mTOR expression in PLN (3 to 14.7-fold, $p < 0.05$) accompanied by a 40 per cent decrease ($p < 0.05$) in total density of mTOR⁺ cells in PLN lymph cords of the rats following 5 weeks of SIDM.

Keywords: streptozotocin-induced diabetes mellitus, lymph nodes, pancreatic, *Glut1*, *mTOR*, *AMPK1 α* , gene expression

Введение

В последние годы стало понятно, что важную роль в механизмах развития сахарного диабета (СД) играют изменения функционального состояния панкреатических лимфатических узлов (ПЛУ), дренирующих панкреатические островки и экзокринную часть поджелудочной железы, а также отдельные сегменты кишечника [3]. Именно в ПЛУ происходит начальная активация диабетогенных CD8⁺ и CD4⁺T-клеток к их миграции в панкреатические островки, а хирургическое удаление ПЛУ у NOD мышей препятствует развитию диабета из-за отсутствия праймирования T-клеток панкреатическими антигенами [9].

С другой стороны, метаболические изменения, которые развиваются в условиях СД, прежде всего гипергликемия, способны непосредственно влиять на иммунометаболизм лимфоцитов [2]. T-клетки экспрессируют ряд транспортеров глюкозы, основным из которых является *Glut1* [19, 16]. Продиабетогенные Th1- и Th17-клетки, вызывающие инсулит, характеризуются высоким уровнем экспрессии *Glut1* и склонностью к гликолизу [17]. У супрессорных Treg, наоборот, низкий уровень экспрессии *Glut1* и высокая скорость окислительного метаболизма [1]. В свою очередь, важным регулятором иммунометаболизма лимфоцитов является протеинкиназа mTOR (англ. mammalian target of rapamycin), которая существует как субъединица внутриклеточных мультимолекулярных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2 [21]. В составе этих комплексов mTOR является «проводником» как внутриклеточных, так и внеклеточных сигналов и служит одним из центральных регуляторов метаболизма, роста, пролиферации и выживания лимфоцитов и других клеток [22], а одним из ее блокаторов является метформин, который действует через AMPK (AMP-activated protein kinase) [7, 13]. Высокая активность mTOR способна усиливать прогрессию диабета через активацию эффекторных провоспалительных субпопуляций лимфоцитов [26, 15], и наоборот, низкая способствует дифференцировке Treg [4, 34], блоки-

рующих инсулит. Поэтому целью работы было выяснить уровень экспрессии мРНК генов *Glut1*, *mTOR* и *AMPK1 α* , а также распределение mTOR⁺ лимфоцитов в ПЛУ крыс с экспериментальным стрептозотоксин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) и после введений метформина.

Материалы и методы

Исследования проведены на 100 самцах крыс линии Вистар весом 115-135 грамм, полученных из питомника Объединение ветеринарной медицины ЧП «Биомодельсервис» (Киев). Животные были разделены на 5 экспериментальных групп по 20 крыс: контрольные крысы, которым однократно внутрибрюшинно вводили 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН = 4,5) (группа 1); крысы с 3-недельным экспериментальным стрептозотоксин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) (группа 2); крысы с 5-недельным экспериментальным стрептозотоксин-индуцированным сахарным диабетом (ЭСИСД) (группа 3); крысы с 3-недельным ЭСИСД (группа 4) и 5-недельным ЭСИСД (группа 5), которым внутрибрюшинно (в/б) ежедневно на протяжении 3 и 5 недель вводили метформин в дозе 50 мг/кг начиная с 1 дня индукции диабета.

Для индукции ЭСИСД стрептозотоксин (STZ) (SIGMA Chemical, США) вводили крысам внутрибрюшинно в дозе 50 мг/кг, растворенного в 0,5 мл 0,1 М цитратного буфера (рН = 4,5) перед самым моментом введения. Время, прошедшее с дня введения препарата, в дальнейшем изложении материала интерпретировалось как длительность течения диабета. Определение концентрации глюкозы в крови, которую брали из хвостовой вены, проводили глюкозооксидазным методом с применением прибора "BIONIMERigh testTMGM 110" (Швейцария) через 12 часов и на 1, 3, 21 и 35 сутки после инъекции стрептозотоксина. Измерение уровня гликемии осуществляли через 6 часов с момента последнего приема пищи. На 21 и 35 сутки после введения STZ животных выводили из эксперимента декапитированием под тиопенталовым

наркозом. Изымали ПЛУ, которые на 20 часов помещали в фиксатор Буэна и после промывки заливали в парапласт.

Структуру популяции mTOR⁺-лимфоцитов изучали на основании анализа серийных гистологических срезов ПЛУ и данных их морфометрических и денситометрических характеристик. Для проведения данного исследования на ротационном микротоме MICROM HR-360 (Microm, Германия) делали 5-микронные серийные срезы ПЛУ, которые потом депарафинизировали в ксилоле, проводили регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%), отмывали в 0,1 М фосфатном буфере (pH = 7,4) и красили с первичными кроличьими поликлональными антителами (ПКАТ) к mTOR (Santa Cruz Biotechnology, США, sc-1550-R) в течение 18 часов во влажной камере при T = 4 °C. После отмывания излишка первичных антител в 0,1 М фосфатном буфере, срезы инкубировали 60 минут (T = 37 °C) с вторичными антителами к полной молекуле IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США), конъюгированными с FITC. После инкубации все срезы промывали 0,1 М фосфатным буфером и помещали в смесь глицерина и фосфатного буфера (1:9) для дальнейшей люминесцентной микроскопии. Обработанные гистологические срезы изучали с помощью компьютерной программы Image J (NIH, США). Изображения, полученные на микроскопе Primo Star (ZEISS, Германия) в ультрафиолетовом спектре возбуждения 390 нм (FITC) при помощи высокочувствительной камеры Axio Cam 5c (ZEISS, Германия) и пакета программ для получения, архивирования и подготовки изображения к публикации Axio Vision 4.7.2 (ZEISS, Германия) немедленно вводили в компьютер. При этом в автоматическом режиме определялись области со статистически значимой флуоресценцией, характерной для лимфоцитов, экспрессирующих mTOR. Вычислялись морфометрические и денситометрические характеристики иммуноположительных клеток. Определяли абсолютную (количество клеток на 1 мм² площади среза) и относительную (%) плотность распределения иммуноположительных клеток различных классов в исследованных зонах ПЛУ. Концентрацию транскрипционного фактора mTOR определяли, учитывая интенсивность флуоресценции идентифицированных иммуноположительных клеток и неспецифическую флуоресценцию препарата (так называемый фон). На основании этих показателей вычислялась скорректированная клеточная флуоресценция (в условных единицах интенсивности флуоресценции УЕИФ): Integrated Density (интегрированная плотность) — (площадь

выделенных клеток * среднюю флуоресценцию фона).

Объектом для молекулярно-генетических исследований методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) у экспериментальных животных были ПЛУ, которые помещали в фиксатор Буэна, проводили дегидратацию в восходящих концентрациях этанола и укладывали в парафиновые блоки. Молекулярно-генетические исследования проведены на архивном материале возрастом 2 года. РНК получали из гистологических срезов толщиной 15 мкм, для этого проводили их депарафинизацию в ксилоле и регидратацию в нисходящих концентрациях этанола (100%, 96%, 70%). Выделение тотальной РНК проводили с использованием набора “Trizol RNA Prep 100” (Изоген Lab., LTD, Россия), который содержит *Trizol reagent* (лизирующий реагент, в состав которого входит денатурирующий агент гуанидинтиоционат и фенол с pH = 4,0) и *ExtraGene E* (суспензия смеси ионообменников). РНК выделяли согласно протоколу к набору.

Для проведения обратной транскрипции и получения кДНК использовали набор ОТ-1 фирмы «Синтол» (Россия). Реакционная смесь общим объемом 25 мкл содержала 1 мкл Random-6 праймера, 2 мкл тотальной РНК, 8,5 мкл деионизированной H₂O, очищенной от нуклеаз, 12,5 мкл 2,5х реакционной смеси и 1 мкл ревертазы MMLV-RT. Обратную транскрипцию проводили при 45 °C в течение 45 минут с последующим нагреванием для инактивации MMLV-RT в течение 5 минут при 92 °C.

Для определения уровня экспрессии исследованных генов *GLUT1* (NM_138827.1), *mTOR* (NM_019906.1) и *AMPK1α* (*Prkaa1*) (NM_019142.2) использовали амплификатор CFX96™ Real-Time PCR Detection Systems (“Bio-Rad Laboratories, Inc.”, США) и набор реактивов Maxima SYBR Green/ROX qPCR MasterMix (2X) (ThermoScientific, США). Финальная реакционная смесь для амплификации включала краситель SYBR Green, ДНК — полимеразу Maxima HotStartTaq DNA Polymerase, по 0,2 мкл прямого и обратного специфических праймеров, 1 мкл матрицы (кДНК). Реакционную смесь доводили до общего объема 25 мкл добавлением деионизированной H₂O. Специфические пары праймеров (5'-3') для анализа исследованных и референсного генов были подобраны с помощью программного обеспечения PrimerBlast (www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast) и изготовлены фирмой Metabion (Германия) (см. табл. 1).

После начальной денатурации в течение 10 минут при 95 °C амплификация состояла из 45 циклов и проводилась при таких условиях: денатура-

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ ДЛЯ АНАЛИЗА ЭКСПРЕССИИ мРНК ИССЛЕДОВАННЫХ И РЕФЕРЕНСНОГО ГЕНОВ

Ген	Праймер	Тпл, °С	Длина продукта (пн)	Экзонный стык
<i>mTor</i>	F = TCTGGCCAAAAGACAGGTGG R = CTGTCCCAGGGTCCACAAAG	60 60	40	2577/ 2578
<i>Slc2a1</i> (<i>Glut1</i>)	F = CGTCGTTGGGATCCTTATTGC R = AGTCTAAGCCGAACACCTGG	59 59	41	724/ 725
<i>Prkaa1</i> (<i>AMPK</i>)	F = GGGAAAGTGAAGGTGGGCAA R = TATGTCCAGTCAACTCGTGCT	60 59	40	127/ 128
<i>GAPDH</i>	F = GCCTGGAGAAACCTGCCAAG R = GCCTGCTTCACCACCTTCT	61 60	52	825/ 826

ция – 95 °С, 15 сек., отжиг – 59–61 °С, 30–60 сек., элонгация – 72 °С, 30 сек. В качестве референс-гена для определения относительного значения изменения уровня экспрессии исследованных генов был использован ген глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназы (*GAPDH*). Относительное нормализованное количество кДНК таргетных генов определяли по методу $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Статистический анализ данных ПЦР проводили при помощи программного обеспечения CFX Manager™ (Bio-Rad, США). В эксперимент были включены негативные контроли: без добавления кДНК матрицы в реакцию ПЦР, без добавления мРНК матрицы в синтезе кДНК, без добавления фермента в синтезе кДНК. Все реакции амплификации проводили на индивидуальных образцах в трех повторах.

Результаты

Введение экспериментальным животным стрептозотоцина приводило к развитию патологического процесса: так, на 3 неделю ЭСИСД концентрация глюкозы в крови у крыс линии Вистар увеличивалась в 3,6 раза ($12,23 \pm 0,4$ ммоль/л, $p < 0,05$) по сравнению с контролем ($3,37 \pm 0,08$ ммоль/л), а на 5 неделю возрастала до $14,39 \pm 0,7$ ммоль/л. Наблюдались полидипсия, гиперфагия и полиурия, то есть все основные симптомы, характерные для СД 1 типа.

Гипергликемия вызывала транскрипционную индукцию гена транспортеров глюкозы *Glut1* в клетках ПЛУ. В частности, развитие диабета приводило к возрастанию уровня мРНК *Glut1* в 9,9 раз ($p < 0,05$) на 3 неделе и в 28,9 раз ($p < 0,05$) на 5 неделе патологического процесса (рис. 1А, Б). Эти изменения сопровождались увеличением уровня мРНК протеинкиназы *mTOR* в 5,3 раза ($p < 0,05$) при 3-недельном и в 3,3 раза ($p < 0,05$) при 5-недельном ЭСИСД (рис. 2В, Г) по сравнению с контрольной группой крыс.

Введение метформина диабетическим крысам приводило к возрастанию уровня транскрипционной активности АМФ-активируемой протеинкиназы *AMPK1α* в ПЛУ. Так, относительное нормализованное количество мРНК гена *AMPK1α* увеличивалось на 87% ($p < 0,05$) на 3 неделе и почти в 38 раз ($p < 0,05$) на 5 неделе развития ЭСИСД (рис. 2А, Б). Наблюдаемая индукция *AMPK1α* закономерно угнетала экспрессию *mTOR*: мы наблюдали уменьшение уровня мРНК мишени рапамицина в ПЛУ в 14,7 раз ($p < 0,05$) при 3-недельном и в 3 раза ($p < 0,05$) при 5-недельном ЭСИСД (рис. 2В, Г) по сравнению с контрольной группой крыс.

Структуру популяции *mTOR*⁺ лимфоцитов изучали на основании анализа серийных гистологических срезов ПЛУ и данных их морфометрических и денситометрических характеристик.

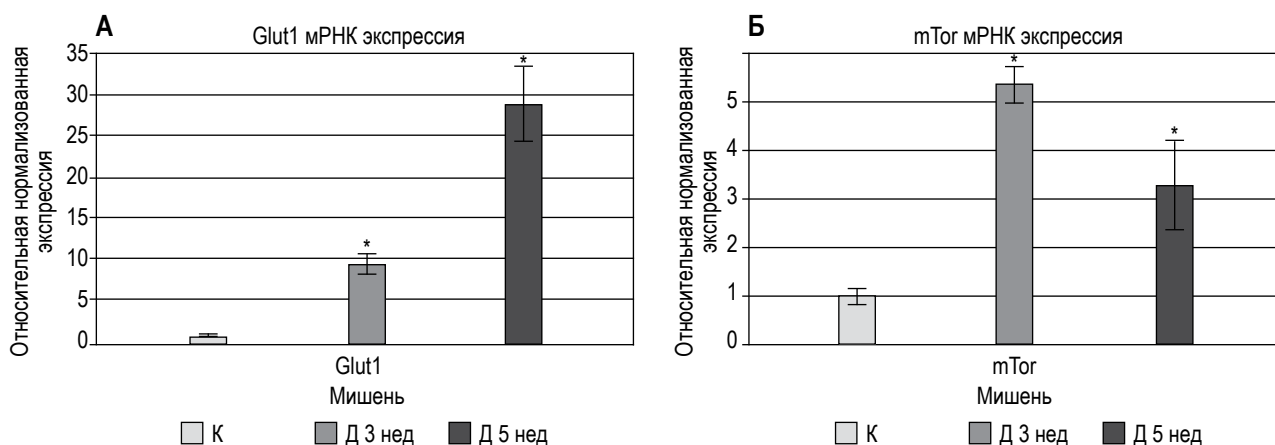


Рисунок 1. Относительное нормализованное количество мРНК генов *Glut1* (А) и *mTOR* (Б) в клетках ПЛУ

Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референс-геном *GAPDH*. к-контроль; д 3 нед., д 5 нед. – 3-х и 5-ти недельный ЭСИСД соответственно.

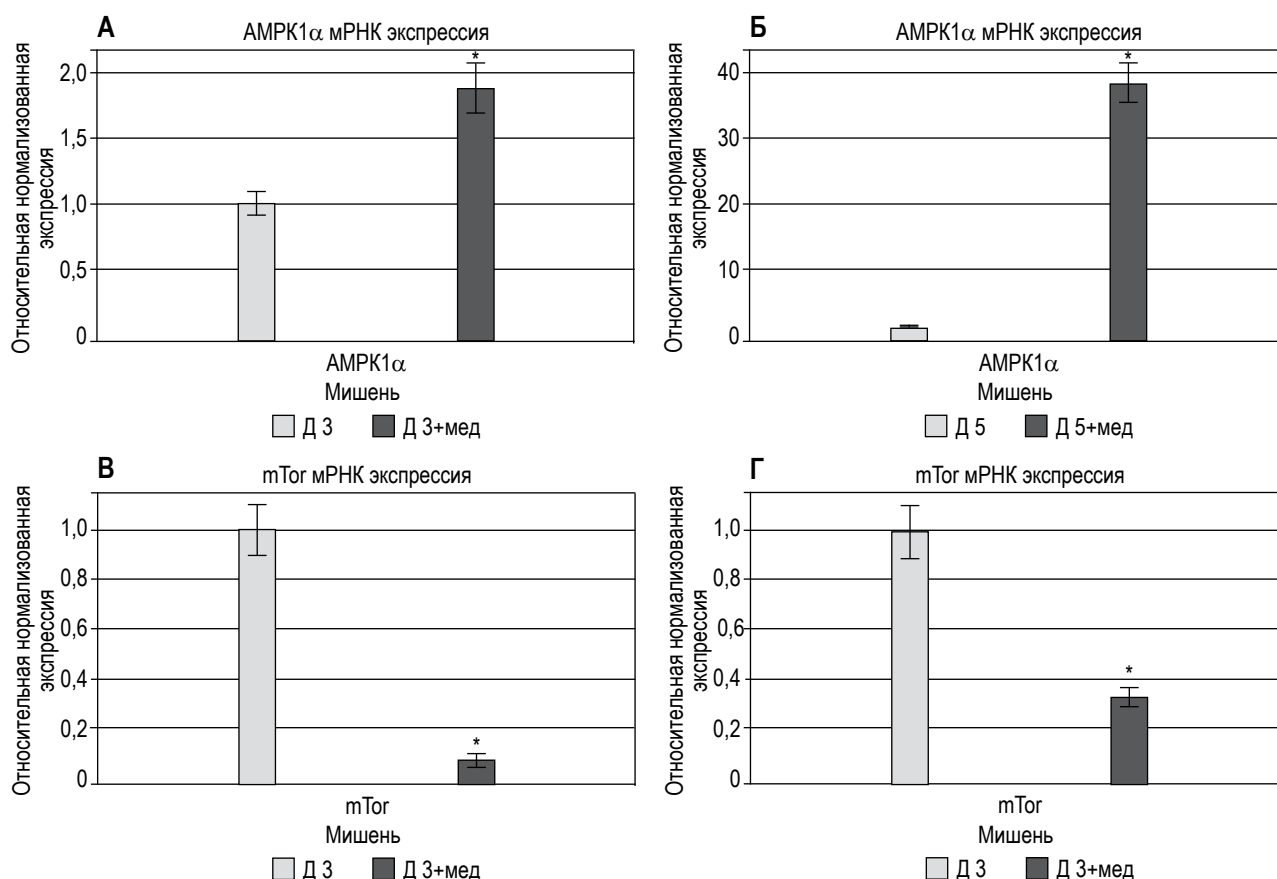


Рисунок 2. Относительное нормализованное количество мРНК генов *AMPK1α* (А, Б) и *mTOR* (В, Г) в клетках ПЛУ после введений метформина диабетическим крысам

Примечание. Нормализация по методу $\Delta\Delta Ct$ с референс-геном *GAPDH*. д 3 нед., д 5 нед. – 3-х и 5-ти недельный ЭСИСД соответственно; д3+метф, д5+метф – введения метформина диабетическим крысам.

Нами установлено, что развитие диабета не влияло на суммарную плотность $mTOR^+$ клеток в ПЛУ на 3 неделю патологического процесса и приводило к их увеличению у крыс с 5-недельным ЭСИСД – на 24% ($p < 0,05$) в паракортикальной зоне и на 34% ($p < 0,05$) в мягкотных тяжах. Изучение распределения отдельных классов $mTOR^+$ клеток показало, что данное увеличение общего количества иммунопозитивных к протеинкиназе $mTOR$ лимфоцитов было вызвано главным образом ростом плотности популяции (ПП) $mTOR^+$ малых лимфоцитов – на 23% ($p < 0,05$) в паракортикальной зоне и на 46% ($p < 0,05$) в мягкотных тяжах и $mTOR^+$ средних лимфоцитов (соответственно, на 22% и 50%, $p < 0,05$).

Введение метформина не влияло на общую численность $mTOR^+$ клеток у крыс с 3-недельным ЭСИСД и приводило к снижению их количества на 40% ($p < 0,05$) в мягкотных тяжах ПЛУ у животных с 5-недельным ЭСИСД. При этом в структуре популяции достоверно изменялась только ПП $mTOR^+$ средних лимфоцитов.

Измерение интенсивности флуоресценции иммунопозитивных клеток показало увеличение

концентрации протеинкиназы $mTOR$ у $mTOR^+$ лимфоцитов и $mTOR^+$ малых лимфоцитов на 3-ю неделю и $mTOR^+$ средних лимфоцитов паракортикальной зоны ПЛУ на 5-ю неделю развития диабета. Введение метформина снижало концентрацию мишени рапамицина в $mTOR^+$ лимфоцитах у животных с 3-недельным ЭСИСД в паракортикальной зоне ПЛУ на 17% ($p < 0,05$) и в мягкотных тяжах на 28% ($p < 0,05$). При увеличении длительности ЭСИСД до 5-ти недель отмечалось также достоверное снижение концентрации $mTOR$ у $mTOR^+$ средних и $mTOR^+$ малых лимфоцитов.

Обсуждение

Лимфоциты чутко реагируют на изменения метаболизма. В качестве таких основных лимфоцитарных сенсоров иммунометаболизма можно выделить: киназу $mTOR$, воспринимающую сигналы от аминокислот, ростовых факторов и др., и являющуюся одним из центральных регуляторов пролиферации и выживания лимфоцитов; ключевой сенсор глюкозы и регулятор энергетического баланса клеток АМФ-активируемая

протеинкиназа (АМРК); рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами PPAR, эндогенными лигандами которых являются свободные жирные кислоты и эйкозаноиды; образ-распознающие рецепторы врожденного иммунитета (TLR, NLR, RLR и др.), активирующиеся не только микробными лигандами, но и целым рядом эндогенных паттернов повреждения, таких как HSP70, HMGB1; сенсоры внеклеточной АТФ с P2XR; сенсоры ксенобиотиков арил-гидрокарбоновые рецепторы (AHR); рецепторы короткоцепочечных жирных кислот FFAR2, лигандами для которых являются такие микробные метаболиты, как бутират, ацетат и пропионат (рис. 3).

Иммунные нарушения приводят к развитию СД 1 типа, а гипергликемия, развивающаяся при этом, усиливает аутоиммунную атаку, приводя к формированию «порочного» круга. Так, CD4⁺T-клетки экспрессируют целый ряд транспортеров глюкозы (Glut), в частности Glut1, 3, 6, и 8 [16]. Glut1 функционирует главным образом на активированных, но не на пребывающих в покое CD4⁺T-клетках, а изменение его экспрессии, наверное, может влиять на уровень дифференцировки CD4⁺Th1- и Th17-клеток. Было показано *in vitro*, что разные субпопуляции CD4⁺T-эффекторных и T-регуляторных клеток отдают предпочтение гликолитическим или окислительным метаболическим программам, которые отличаются, контролируя уровень поглощения ими глюкозы. Несмотря на экспрессию различных транспортеров глюкозы, дефицит Glut1 избирательно нарушает метаболизм и функции тимоцитов и T-эффекторных клеток, предотвращая их

пролиферацию и уменьшая выживание и дифференцировку [16]. Важно также то, что дефицит Glut1 уменьшает экспансию эффекторных лимфоцитов и их способность вызывать воспалительные заболевания *in vivo*. Клетки Treg, наоборот, оказались нечувствительными к уровню экспрессии Glut1 и их способность к супрессии при этом не страдала. Таким образом, метаболические отличия субпопуляций лимфоцитов состоят в том, что Th1, Th2 и клетки Th17 характеризуются высоким уровнем экспрессии транспортера глюкозы Glut1, и чрезвычайно высокой способностью к гликолизу. У Treg, наоборот, низкий уровень экспрессии Glut1 и высокая скорость окислительного метаболизма. Таким образом, влияя на метаболические программы лимфоцитов, можно манипулировать численностью их отдельных субпопуляций. Так, авторы показали, что стимуляции AMP-активированной протеинкиназы было достаточно, чтоб уменьшить экспрессию Glut1 и увеличить генерацию Treg в модели астмы [10].

Другим важным регулятором метаболизма лимфоцитов является mTOR — протеинкиназа серин-треониновой специфичности, которая в клетке существует как субъединица внутриклеточных сигнальных комплексов mTORC1 и mTORC2. mTOR-сигнализация является одной из основных детерминант T-клеточной дифференцировки [30, 31]. При высокой активности mTOR происходит дифференцировка наивных CD4⁺ клеток в эффекторные провоспалительные субпопуляции Th1, Th2, Th17, а также активация цитотоксических CD8⁺ клеток [28] (рис. 3).

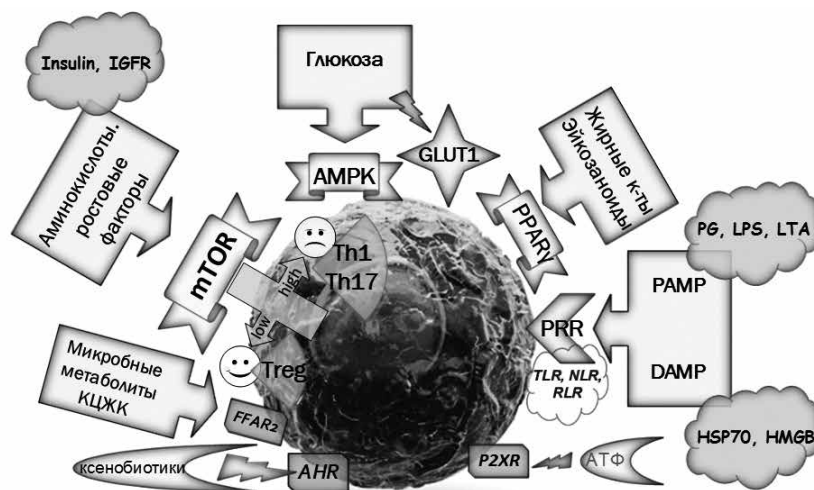


Рисунок 3. Лимфоцит как сенсор изменений метаболизма

Примечание. Условные обозначения: mTOR — мишень рапамицина, AMPK — АМФ-активируемая протеинкиназа, PPAR γ — рецепторы, активируемые пероксисомными пролифераторами, Glut1 — транспортеры глюкозы 1 типа, P2XR — пуринергические рецепторы, FFAR2 — рецепторы короткоцепочечных жирных кислот, AHR — арил-гидрокарбоновые рецепторы, PRR — образ-распознающие рецепторы врожденного иммунитета, PAMP — патоген-ассоциированные молекулярные паттерны, DAMP — молекулярные паттерны, ассоциированные с повреждением.

И наоборот, если активность mTOR в CD4⁺ клетках низкая, то они дифференцируются в Treg-клетки, которые блокируют развитие инсулита и прогрессию диабета [5, 23].

Таким образом, установленное нами увеличение уровня мРНК генов транспортеров глюкозы Glut1 и протеинкиназы mTOR в клетках ПЛУ при диабете является важным триггером их дифференцировки в эффекторные провоспалительные субпопуляции Th1 и Th17.

В свою очередь, важным стратегическим заданием есть поиск эффективных путей коррекции иммунных нарушений, развивающихся при СД и поддерживающих его прогрессию. Одной из перспективных терапевтических мишеней при СД есть ингибиторы mTOR. В связи с этим мы остановили свой выбор на метформине, который способен снижать концентрацию глюкозы в крови через АМФ-активируемую протеинкиназу (АМФК) [25]. Метформин, как и рапамицин, но более мягко, без развития иммуносупрессии, угнетает активность mTOR [12]. Интересно, что сигнализация через mTOR вызывает метаболическое перепрограммирование лимфоцитов, стимулируя гликолиз *c-MYC* — зависимым путем, что повышает пролиферацию иммунных клеток [29]. Метформин способен и непосредственно, без участия mTOR, как АМФК-зависимым, так и АМФК-независимым путем [33] влиять на метаболизм лимфоцитов. Так, у Т-лимфоцитов АМРК-зависимая сигнализация важна для образования Т-клеток памяти в динамике иммунного ответа [24]. Способность метформина через активизацию АМРК угнетать выработку эффекторных Т-лимфоцитов и стимулировать дифференцировку Т-клеток памяти была подтверждена целым рядом исследований [14, 20]. Провоспа-

лительные действия метформина объясняют его способность угнетать развитие аутоиммунных заболеваний [18]. Кроме того, метформин ингибирует пролиферацию и выживание опухолевых клеток в условиях острого миелоидного и Т-клеточного острого лимфобластного лейкозов [11], влияет на эмиграцию Т-клеток из тимуса у пациентов с СД 2 типа [6]. Kang K. et al. (2013) продемонстрировали способность метформина уменьшать количество RORγt⁺ CD4⁺Th17-клеток в лимфатических узлах у мышей с аутоиммунным ревматоидным артритом, снижать уровень сывороточных провоспалительных цитокинов TNFα и IL-1 [14]. Способность метформина блокировать активацию Th17-клеток, продукцию IFNγ и IL-17 была продемонстрирована и на модели системной красной волчанки [32]. Эффекты метформина на уровень иммунного ответа также реализуются через ингибирование МНС-рестриктированной презентации антигенов АПК, в частности путем супрессии продукции дендритными клетками костимулирующих факторов, таких как CD54, CD80 и CD86 [27]. В недавнем исследовании Forslund K. et al. (2015) продемонстрирована способность метформина вызывать изменения в кишечном микробиоме у пациентов с СД 2 типа, в частности влиять на продукцию короткоцепочных жирных кислот [8], которые через свои рецепторы, в частности FFAR2, влияют на дифференцировку Т-клеток, особенно Treg. Установленные нами возрастание уровня мРНК АМРК1α и угнетение экспрессии mTOR в ПЛУ после введений метформина диабетическим крысам свидетельствуют о возможности его использования для коррекции иммунных нарушений, развивающихся при СД.

Список литературы / References

1. Basu S., Hubbard B., Shevach E.M. Foxp3-mediated inhibition of Akt inhibits Glut1 (glucose transporter 1) expression in human T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 97, no. 2, pp. 279-283.
2. Buck M.D., O'Sullivan D., Pearce E.L. T cell metabolism drives immunity. *J. Exp. Med.*, 2015, Vol. 212, no. 9, pp. 1345-1360.
3. Calderon B., Unanue E. Antigen presentation events in autoimmune diabetes. *Curr. Opin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 1, pp. 119-128.
4. Chapman N.M., Chi H. mTOR signaling, Tregs and immune modulation. *Immunotherapy*, 2014, Vol. 6, no. 12, pp. 1295-1311.
5. Chi H. Regulation and function of mTOR signalling in T cell fate decisions. *J. Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 325, p. 38.
6. Dworacki G., Urazayev O., Bekmukhambetov Y., Iskakova S., Frycz B.A., Jagodziński P.P., Dworacka M. Thymic emigration patterns in patients with type 2 diabetes treated with metformin. *Immunology*, 2015, Vol. 146, no. 3, pp. 456-469.
7. Foretz M., Guigas B., Bertrand L., Pollak M., Viollet B. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 6, pp. 953-966.
8. Forslund K., Hildebrand F., Nielsen T., Falony G. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature*, 2015, Vol. 528, no. 7581, pp. 262-266.
9. Gagnerault M., Lua J., Lotto C., Lepau F. Pancreatic lymph nodes are required for priming of β cell reactive T cells in NOD mice. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, pp. 369-377.
10. Gerriets V., Rathmell J. Metabolic pathways in T cell fate and function. *Trends Immunol.*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 168-173.

11. Green A.S., Chapuis N., Trovati M.T., Willems L., Lambert M., Arnoult C. The LKB1/AMPK signaling pathway has tumor suppressor activity in acute myeloid leukemia through the repression of mTOR-dependent oncogenic mRNA translation. *Blood*, 2010, Vol. 116, pp. 4262-4273.
12. Hardie D. AMPK: a target for drugs and natural products with effects on both diabetes and cancer. *J. Diabetes*, 2013, Vol. 216, p. 72.
13. Hardie D.G., Ashford M.L. AMPK: regulating energy balance at the cellular and whole body levels. *Physiology (Bethesda)*, 2014, Vol. 29, no. 2, pp. 99-107.
14. Kang K.Y., Kim Y.K., Yi H., Kim J., Jung H.R., Kim I.J., Cho J.H., Park S.H., Kim H.Y., Ju J.H. Metformin down regulates Th17 cells differentiation and attenuates murine autoimmune arthritis. *Int. Immunopharmacol.*, 2013, Vol. 16, no. 1, pp. 85-92.
15. Liu Y., Zhang D.T., Liu X.G. mTOR signaling in T cell immunity and autoimmunity. *Int. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 34, no. 1, pp. 50-66.
16. Macintyre A.N., Gerriets V.A., Nichols A.G., Michalek R.D., Rudolph M.C., Deoliveira D., Anderson S.M., Abel E.D., Chen B.J., Hale L.P., Rathmell J.C. The glucose transporter Glut1 is selectively essential for CD4 T cell activation and effector function. *Cell Metab.*, 2014, Vol. 20, no. 1, pp. 61-72.
17. Michalek R.D., Gerriets V.A., Jacobs S.R., Macintyre A.N., MacIver N.J., Mason E.F., Sullivan S.A., Nichols A.G., Rathmell J.C. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 6, pp. 3299-3303.
18. Nath N., Khan M., Paintlia M.K., Hoda M.N., Giri S. Metformin Attenuated the Autoimmune Disease of the Central Nervous System in Animal Models of Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*, 2009, 182, pp. 8005-8014.
19. Palmer C.S., Hussain T., Duette G., Weller T.J., Ostrowski M., Sada-Ovalle I., Crowe S.M. Regulators of glucose metabolism in CD4⁺ and CD8⁺ T cells. *Int. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 25, pp. 1-12.
20. Pearce E.L., Walsh M.C., Cepas P.J., Harms G.M., Shen H., Wang L.S., Jones R.G., Choi Y. Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism. *Nature*, 2009, Vol. 460, pp. 103-107.
21. Pollizzi K.N., Patel C.H., Sun I.H., Oh M.H., Waickman A.T., Wen J., Delgoffe G.M., Powell J.D. mTORC1 and mTORC2 selectively regulate CD8⁺ T cell differentiation. *J. Clin. Invest.*, 2015, Vol. 125, no. 5, pp. 2090-2108.
22. Pollizzi K.N., Powell J.D. Regulation of T cells by mTOR: the known knowns and the known unknowns. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 13-20.
23. Powell J.D., Pollizzi K.N., Heikamp E.B., Horton M.R. Regulation of immune responses by mTOR. *Annu Rev. Immunol.*, 2012, pp. 39-68.
24. Rolf J., Zarrouk M., Finlay D.K., Foretz M., Viollet B., Cantrell D.A. AMPK α 1: A glucose sensor that controls CD8 T-cell memory. *Eur. J. Immunol.*, 2013, Vol. 43, no. 4, pp. 889-896.
25. Russo G.L., Russo M., Ungaro P. AMP-activated protein kinase: a target for old drugs against diabetes and cancer. *J. Biochem. Pharmacol.*, 2013, Vol. 339, p. 50.
26. Shan J., Feng L., Sun G., Chen P., Zhou Y., Xia M., Li H., Li Y. Interplay between mTOR and STAT5 signaling modulates the balance between regulatory and effective T cells. *Immunobiology*, 2015, Vol. 220, no. 4, pp. 510-517.
27. Shin S., Hyun B., Lee A., Kong H., Han S., Lee C.K., Ha N.J., Kim K. Metformin Suppresses MHC-Restricted Antigen Presentation by Inhibiting Co-Stimulatory Factors and MHC Molecules in APCs. *Biomol. Ther.*, 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 35-41.
28. Waickman A.T., Powell J.D. mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *J. Immunol Rev.*, 2012, pp. 43-58.
29. Wang R., Dillon C.P., Shi L.Z., Milasta S., Carter R., Finkelstein D., McCormick L.L., Fitzgerald P., Chi H., Munger J., Green D.R. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*, 2011, Vol. 35, pp. 871-882.
30. Xu X., Ye L., Araki K., Ahmed R. mTOR, linking metabolism and immunity. *Semin. Immunol.*, 2012, Vol. 24, no. 6, pp. 429-435.
31. Yang K., Chi H. mTOR and metabolic pathways in T cell quiescence and functional activation. *Semin. Immunol.*, 2012, Vol. 421, p. 8.
32. Yin Y., Choi S.C., Xu Z., Zeumer L., Kanda N., Croker B.P., Morel L. Glucose Oxidation Is Critical for CD4⁺ T Cell Activation in a Mouse Model of Systemic Lupus Erythematosus. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 25, pp. 80-90.
33. Zarrouk M., Finlay D.K., Foretz M., Viollet B., Cantrell D.A. Adenosine-mono-phosphate-activated protein kinase-independent effects of metformin in T cells. *PLoS One.*, 2014, Vol. 2, no. 9, e. 106710.
34. Zeng H., Chi H. Metabolic control of regulatory T cell development and function. *Trends Immunol.*, 2015, Vol. 36, no. 1, pp. 3-12.

Авторы:

Путилин Д.А. — ассистент кафедры нормальной физиологии, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина
Камышный А.М. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, заведующий молекулярно-генетической лабораторией, Запорожский государственный медицинский университет, г. Запорожье, Украина

Authors:

Putilin D.A., Assistant Professor, Department of Normal Physiology, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine
Kamysnyy A.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, Department of Microbiology, Virology, and Immunology, Head, Laboratory of Molecular Genetics, Zaporozhye State Medical University, Zaporozhye, Ukraine

Поступила 22.04.2016
Отправлена на доработку 31.05.2016
Принята к печати 20.06.2016

Received 22.04.2016
Revision received 31.05.2016
Accepted 20.06.2016

ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ИНТЕРФЕРОН- α -ИНДУЦИРОВАННУЮ ДИФФЕРЕНЦИРОВКУ МОНОЦИТОВ В ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ

**Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В.,
Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р.**

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

Резюме. Интерфероны I типа являются мощными индукторами дифференцировки моноцитов в дендритные клетки (ДК), однако чувствительность таких ДК к толерогенному эффекту глюкокортикоидов ранее не исследовалась. Целью работы явилось изучение влияния дексаметазона на созревание и функции интерферон-альфа-индуцированных ДК (IFN-ДК) здоровых доноров. ДК генерировали из моноцитов крови, которые культивировали в течение 5 суток с GM-CSF и IFN α в отсутствие и присутствии дексаметазона (10^{-6} М), вносимого на 3 сутки. Добавление дексаметазона блокировало созревание IFN-ДК, что проявлялось возрастанием доли CD14⁺ клеток и снижением содержания CD83⁺ клеток. Дексаметазон не оказывал значимого влияния на экспрессию HLA-DR, CD86 и B7-H1, однако 2-кратно усиливал экспрессию толерогенной молекулы TLR-2. Наряду с подавлением созревания IFN-ДК, дексаметазон ингибировал продукцию ими провоспалительных/Th1-цитокинов (TNF α , IL-1, IL-2, IFN γ , IL-12) и хемокинов (MIP-1 α , RANTES). IFN-ДК, генерированные в присутствии дексаметазона, отличались 2-кратным снижением аллостимуляторной активности в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). При этом способность IFN-ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ прямо коррелирует с экспрессией на ДК молекулы CD83 и обратно — с экспрессией CD14 и TLR-2. Оценка Th1-/Th2-поляризующей активности IFN-ДК показала, что дексаметазон оказывал выраженное ингибирующее влияние на способность ДК стимулировать Т-клетки к продукции IFN γ , тогда как супрессорный эффект на способность ДК стимулировать продукцию IL-6 был менее выраженным, что свидетельствует о доминировании Th2-поляризующей активности IFN-ДК под влиянием дексаметазона. В целом показано, что IFN-ДК чувствительны к толерогенному действию дексаметазона и, следовательно, могут опосредовать иммуномодулирующий эффект глюкокортикоидной терапии, а также рассматриваться в качестве новых кандидатов для разработки толерогенных лечебных ДК-вакцин при аутоиммунной патологии.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон- α , дексаметазон, алло-СКЛ, цитокины

Адрес для переписки:

Курочкина Юлия Дмитриевна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, Ядринцевская ул., 14.
Тел.: 8 (383) 228-21-01.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: juli_k@bk.ru; ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Kurochkina Yuliya D.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 228-21-01.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: juli_k@bk.ru; ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.Д. Курочкина, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова,
Т.В. Тыринова, Е.В. Баторов, А.Э. Сизиков,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Влияние дексаметазона
на интерферон- α -индуцированную дифференцировку
моноцитов в дендритные клетки» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 347–356.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356

© Курочкина Ю.Д. и соавт., 2016

For citation:

Yu.D. Kurochkina, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova,
T.V. Tyrinova, E.V. Batorov, A.E. Sizikov, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh "Effect of dexamethasone on interferon- α -induced
differentiation of monocytes to dendritic cells", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4,
pp. 347–356. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-347-356>

EFFECT OF DEXAMETHASONE ON INTERFERON- α -INDUCED DIFFERENTIATION OF MONOCYTES TO DENDRITIC CELLS

Kurochkina Yu.D., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

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

Abstract. Type I Interferons are potent inducers of monocyte's differentiation into dendritic cells (DCs). However, sensitivity of these DCs to tolerogenic effect of glucocorticoids has not been previously investigated. The aim of this study was to investigate the effect of dexamethasone upon maturation and functions of interferon-alpha-induced DCs (IFN-DC) derived from healthy donors. DCs were generated from blood monocytes cultured for 5 days with GM-CSF and IFN α , in absence or with addition of dexamethasone (10^{-6} M), applied on the 3rd day. Addition of dexamethasone inhibited IFN-DC maturation, which manifested with increasing numbers of CD14⁺ cells and decreased percentage of CD83⁺ DCs. Dexamethasone did not significantly influence HLA-DR, CD86 and B7H1 expression. However, it caused a 2-fold increase of tolerogenic TLR-2 molecule expression. Along with suppression of IFN-DC maturation, dexamethasone inhibited production of proinflammatory/Th1 cytokines (TNF α , IL-1, IL-2, IFN γ , IL-12), and some chemokines (MIP-1 α , RANTES). Dexamethasone-treated IFN-DCs exhibited a 2-fold lower allostimulatory activity in mixed lymphocyte culture (MLC). Worth of note, the capacity of IFN-DCs to stimulate T cell proliferative response in allo-MLC showed direct correlation with CD83 expression on DCs, and an inverse correlation with CD14 and TLR-2. Evaluation of Th1/Th2-polarizing activity of IFN-DCs showed that dexamethasone exerted a pronounced inhibitory effect upon ability of DCs to stimulate T cells for IFN γ production, along with low-grade suppressive effect upon ability of DCs to induce IL-6 production, thus being indicative for a dominance of Th2-polarizing activity of IFN-DCs under the influence of dexamethasone. In general, the data obtained show that IFN-DCs are sensitive to tolerogenic action of dexamethasone, and, hence, the IFN-DCs may mediate the immunomodulatory effect of glucocorticosteroids and represent novel candidate cells for the development of therapeutic tolerogenic DC-based vaccines applicable for management of autoimmune disorders.

Keywords: dendritic cells, interferon- α , dexamethasone, allo-MLC, cytokines

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются наиболее эффективными антиген-презентирующими клетками, которые могут индуцировать развитие как иммунного ответа, так и иммунологической толерантности. Толерогенные свойства ДК, которые связывают с их способностью вызывать анергию и апоптоз Т-лимфоцитов, Th1-Th2-переключение и генерацию регуляторных Т-клеток, опосредуются с вовлечением различных механизмов, включая экспрессию поверхностных проапоптогенных/коингибиторных молекул (PD-L1, FasL, TLR-2, ILT-2,4 и др.), активацию индоламин-2,3-диоксигеназы и продукцию противовоспалительных цитокинов [1, 14, 15].

Интерес к толерогенным ДК, прежде всего, обусловлен потенциальной возможностью их использования в лечении аутоиммунных заболеваний (АИЗ). Стратегии применения тДК обсуждаются как в аспекте вакцинации пациентов генерированными *ex vivo* тДК, так и индукции толерогенного потенциала ДК *in vivo*, либо усиления толерогенных свойств вводимых ДК с помо-

щью фармакологических средств [11, 13, 20]. ДК *in vitro* обычно получают путем культивирования моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IL-4 (так называемые IL4-ДК) [28], используя для индукции стабильного толерогенного потенциала ДК дексаметазон и/или рецепторные агонисты витамина D [14].

Дифференцировка моноцитов в ДК может также индуцироваться интерферонами I типа, которые продуцируются в ответ на инфекционные и воспалительные стимулы, являются сигналами опасности и способны вызывать быструю дифференцировку циркулирующих моноцитов в ДК [10]. Генерируемые в присутствии GM-CSF и IFN α ДК (IFN-ДК) представляют уникальную популяцию функционально активных клеток, комбинирующих свойства миелоидных ДК, плазмацитоидных ДК и НК-клеток. Более высокая миграционная активность IFN-ДК и их более стабильный фенотип (в отсутствие цитокинов) по сравнению с IL4-ДК [6, 19, 25] делает эти клетки привлекательными кандидатами для использования в качестве ДК-вакцин. Однако чув-

ствительность IFN-ДК к толерогенным сигналам ранее не исследовалась.

Интерес к IFN-ДК и их чувствительности к толерогенным сигналам связан не только с перспективами их использования в качестве новой клеточной платформы при создании ДК-вакцин, но важной патогенетической ролью IFN α при аутоиммунной патологии. Действительно, терапия препаратами интерферонов сопровождается частым развитием аутоиммунных осложнений, при этом многие аутоиммунные заболевания ассоциированы с повышенным уровнем интерферонов I типа и контролируемых ими генов [2, 23]. Таким образом, у больных АИЗ интерферон-альфа может играть важную роль в дифференцировке ДК из моноцитов и поддержании активированного статуса циркулирующих ДК [3, 12]. Используемые в комплексном лечении АИЗ глюкокортикоиды, по данным литературы, способны индуцировать толерогенный фенотип IL4-ДК [17, 21]. В то же время вопрос о чувствительности IFN-ДК к действию глюкокортикоидов, остается открытым.

Исходя из вышесказанного, **целью настоящей работы** явилось исследование влияния дексаметазона на IFN α -индуцированную дифференцировку моноцитов в ДК.

Материалы и методы

Исследования были проведены в группе 25 здоровых доноров. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной гепаринизированной крови выделяли стандартным методом градиентного центрифугирования на фиколе-верографине. Для генерации ДК прилипающую фракцию МНК культивировали в течение 4 сут. при 37 °С в CO₂-инкубаторе в 6-луночных планшетах (Nunclon, Дания) в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, Биолот, Санкт-Петербург), в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания на 4 сут. вносили липополисахарид (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS *E. coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивирование в течение последующих 24 часов. Генерацию IFN-ДК проводили в отсутствие (контрольные культуры) и присутствии дексаметазона (10⁻⁶ М), который добавляли на 3 сут. Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITS-

или PE-меченных моноклональных анти-CD14, -CD83, -CD86, -HLA-DR, -TLR-2, -B7H1 антител (BD PharMingen, США).

Концентрацию цитокинов TNF α и IL-10, а также IFN γ и IL-6 в супернатантах соответствующих клеточных культур оценивали методом иммуноферментного анализа, используя коммерческие тест-системы («Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Расширенный спектр цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, Eotaxin), в культурах генерированных IFN-ДК оценивали методом проточной флуориметрии на 2-лучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией фирмы-производителя.

Аллостимуляторную активность IFN-ДК оценивали в смешанной культуре лимфоцитов (СКЛ). В качестве отвечающих клеток использовали МНК доноров (0,1 $\times$ 10⁶/лунку), которые культивировали в 96-луночных круглодонных планшетах в среде RPMI-1640 в присутствии 10% инактивированной сыворотки крови АВ(IV) группы при 37 °С в CO₂-инкубаторе. Стимуляторами служили аллогенные IFN-ДК в соотношении МНК:ДК = 10:1. Пролиферативный ответ оценивали на 5 сут. радиометрически по включению ³H-тимидина (1 мкКю/лунку), вносимого за 18 ч до окончания культивирования. Индекс влияния ДК (ИВ) в алло-СКЛ рассчитывали как отношение пролиферативного ответа МНК в присутствии ДК к уровню спонтанной пролиферации МНК.

Способность IFN-ДК активировать Th1- и Th2-клетки также оценивали в алло-СКЛ (как описано выше). Культуральные супернатанты собирали на 5 сут., и измеряли концентрацию Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-6) цитокинов методом ИФА.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей (Q_{0,25}-Q_{0,75}). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии: U-критерий Вилкоксона—Манна—Уитни и парный критерий знаков. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

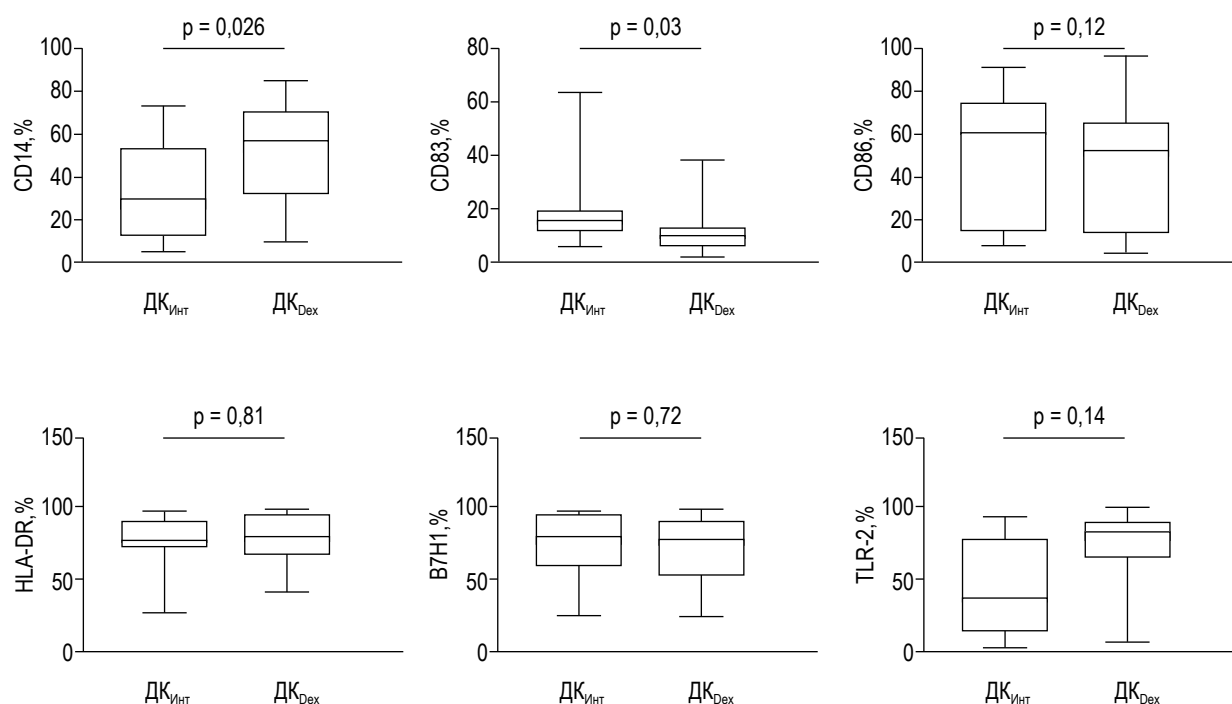


Рисунок 1. Влияние дексаметазона на фенотип IFN-ДК

Примечание. Данные представлены в виде медиан (сплошная горизонтальная линия), интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений. На диаграммах показано относительное (%) содержание CD14⁺ (n = 15), CD83⁺ (n = 20), HLA-DR⁺ (n = 20), CD86⁺ (n = 15), B7-H1⁺ (n = 8) и TLR-2⁺ (n = 20) клеток в популяции IFN-ДК, генерированных в стандартных условиях (ДК_{ИНТ}) и в присутствии 10⁻⁶ М дексаметазона (ДК_{Дек}). p – непараметрический парный критерий знаков.

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ПРОДУКЦИЮ TNFα И IL-10 В КУЛЬТУРАХ IFN-ДК

Цитокины		Контроль	Dex+	p _U
TNFα (пг/мл)	Медиана	3660	415	
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	1495-4446	270-1455	0,035
IL-10 (пг/мл)	Медиана	1834	1020	0,4
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	666-2224	750-1540	
TNFα/IL-10 (расч. ед.)	Медиана	2,0	0,33	0,04
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	1,2-2,8	0,2-2,8	

Примечание. С помощью ИФА оценивали концентрацию цитокинов в супернатантах IFN-ДК доноров (n = 9), генерированных в отсутствие (контроль) и присутствии (Dex+) дексаметазона (10⁻⁶ М). p_U – критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты

Известно, что толерогенный эффект глюкокортикоидов на IL4-ДК связан с подавлением их созревания [21]. Поэтому первоначально было исследовано влияние дексаметазона на экспрессию поверхностных молекул, включая маркеры зрелости, а также антигены гистосовместимости, коингибиторные и коингибиторные молекулы (рис. 1). Одной из особенностей IFN-ДК по сравнению с IL4-ДК является сохранение значитель-

ной частью этих клеток (даже после индукции их созревания) моноцитарного маркера CD14 [10]. Генерируемые в присутствии дексаметазона IFN-ДК (ДК_{Дек}) отличались от контрольных, интактных ДК (ДК_{ИНТ}) еще более высоким содержанием CD14⁺ клеток и меньшей долей CD83⁺ клеток, что свидетельствовало о подавлении созревания IFN-ДК. Относительное содержание HLA-DR⁺ и CD86⁺ клеток в популяции IFN-ДК значимо не менялось под влиянием дексаметазона. Вместе с тем, дексаметазон более чем в 2

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ЦИТОКИНОВЫЙ ПРОФИЛЬ IFN-ДК

Группы	Цитокины (пг/мл)	Контроль		Dex+	
		Медиана	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$	Медиана	$Q_{0,25}-Q_{0,75}$
Про- и противовоспалительные	TNF α	64970	36190-96750	7003*	385-7240
	IL-1 β	610	600-1120	140*	100-160
	IL1-ra	8730	8620-11530	7934	5750-8050
	IL-10	2215	1030-3075	2198	735-2770
Иммунорегуляторные (Th1, Th2, Th9, Th17)	IL-2	190	150-198	32*	12-35
	IFN γ	4790	3620-4970	2292*	1480-3180
	IL-12(p70)	390	210-460	47*	40-85
	IL-4	61	60-71	41	24-50
	IL-5	5,6	5-8,5	5,6	2,2-6,2
	IL-6	19520	18480-20960	14940	10080-19420
	IL-9	104	84-124	64	60-105
	IL-13	85	70-106	64	40-74
	IL-15	213	200-340	247	240-280
	IL-17	530	440-610	447	260-550
Ростовые факторы	G-CSF	8079	7580-12180	4795	2320-10220
	IL-7	35	35-40	16	13-60
	FGF- β	145	140-220	78	70-102
	PDGF	3055	2955-3630	2510	1835-2770
	VEGF	1420	1080-19210	958*	950-960
СХС- и СС-хемокины	IL-8	155370	144070-171170	126670	122350-152885
	IP-10	170600	134290-190320	137640	18990-168530
	MCP-1	57430	29180-74960	33965	5720-53560
	MIP-1 α	77000	76000-80000	53561*	5710-75000
	RANTES	26160	13260-48430	2804*	1265-13560
	Eotaxin	880	610-950	385	225-535

Примечание. С помощью мультиплексного анализа оценивали концентрацию цитокинов в супернатантах IFN-ДК доноров ($n = 5$), генерированных в отсутствие (контроль) и присутствии (Dex+) дексаметазона (10^{-6} М). * – $p_U < 0,05$ достоверность различий по сравнению с контролем, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

раза усиливал экспрессию TLR2 ($p_U = 0,14$), ассоциированного с толерогенной активностью ДК. Эффект дексаметазона на коингибиторную молекулу B7-H1 (PD-L1) был менее выраженным и статистически недостоверным.

Поскольку созревание ДК индуцируется провоспалительными цитокинами (в первую очередь TNF α), продукция которых усиливается при стимуляции ЛПС, ингибирующий эффект дексаметазона на IFN-ДК мог быть обусловлен подавлением синтеза TNF α . Действительно, из данных таблицы 1 видно, что в присутствии дексаметазона эндогенная продукция TNF α снижалась в среднем с 3660 до 415 пг/мл ($p_U = 0,035$).

При этом дексаметазон не оказывал выраженного ингибирующего эффекта на секрецию IL-10. В результате индекс соотношения TNF α /IL-10 в культурах ДК_{Dex} был в 6 раз ниже, чем в культурах интактных IFN-ДК (0,33 против 2,0 расч. ед. соответственно), что свидетельствовало о доминировании активности противовоспалительных цитокинов. Важно отметить, что выявленное снижение концентрации TNF α не было связано с токсическим действием дексаметазона на IFN-ДК, поскольку выход клеток в культурах ДК_{Int} и ДК_{Dex} значимо не различался, составляя в среднем 0,12 и 0,19 $\times 10^6$ /1 млн МНК соответственно ($p_U = 0,06$).

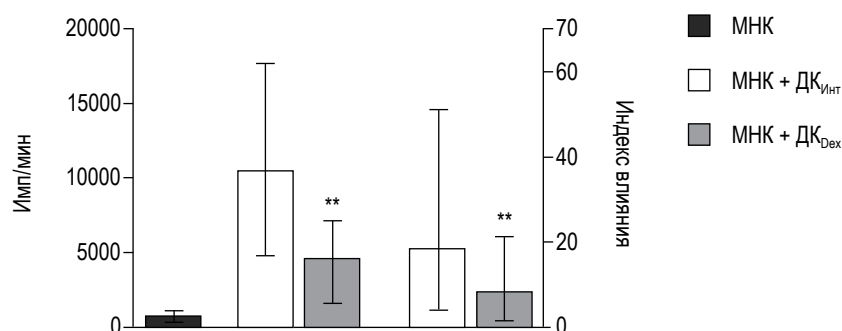


Рисунок 2. Супрессорный эффект дексаметазона на аллостимуляторную активность IFN-ДК

Примечание. Представлены данные (Me; IQR; n = 21) по пролиферации (имп/мин) МНК в отсутствие IFN-ДК, а также в алло-СКЛ в присутствии интактных ИФН-ДК, генерированных в стандартных условиях (МНК + ДК_{Инт}) или с дексаметазоном в дозе 10⁻⁶ М (МНК + ДК_{Дек}). По правой оси ординат представлены индексы влияния (расч. ед.) IFN-ДК в алло-СКЛ. ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с интактными ДК (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА Th1- и Th2-ПОЛЯРИЗУЮЩУЮ АКТИВНОСТЬ IFN-ДК В АЛЛО-СКЛ

Цитокины МНК ₀		Условия культивирования		
		МНК + ДК _{Инт}	МНК + ДК _{Дек}	
IFN γ (пг/мл)	Медиана	30	1100	80**
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	9-46	580-1420	8-270
IL-6 (пг/мл)	Медиана	750	10020	8320*
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	240-7225	9280-10690	7090-8960
IL-6/IFN γ (расч. ед.)	Медиана	42	11	162**
	Q _{0,25} -Q _{0,75}	22-150	6-19	24-1090

Примечание. МНК культивировали в отсутствие (МНК₀) или присутствии аллогенных IFN-ДК доноров (n = 13), генерированных в стандартных условиях (МНК + ДК_{Инт}) или с дексаметазоном в дозе 10⁻⁶ М (МНК + ДК_{Дек}). Концентрацию IFN γ и IL-6 в 5-суточных супернатантах алло-СКЛ оценивали с помощью ИФА. * – p < 0,05; ** – p < 0,01 – достоверность различия показателей по сравнению с интактными ДК (U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Чтобы более полно охарактеризовать влияние дексаметазона на цитокиновый профиль IFN-ДК, в отдельной серии экспериментов был проведен мультиплексный анализ 25 различных цитокинов, включая про-/противовоспалительные цитокины (TNF α , IL-1 β , IL-1ra, IL-10), иммунорегуляторные цитокины (IL-2, IFN γ , IL-12, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-13, IL-15, IL-17), ростовые факторы (G-CSF, IL-7, FGF- β , PDGF, VEGF) и хемокины (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES, Eotaxin). Видно (табл. 2), что интактные IFN-ДК являются активными продуцентами широкого спектра цитокинов, интенсивность секреции которых отличается значительной вариабельностью. Так, часть цитокинов (TNF α , IL-6) и хемокинов (IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 α , RANTES) синтезируются на исключительно высоком уровне (> 10000 пг/мл). Продукция относительно небольшой группы интерлейкинов (IL-4, IL-5, IL-13 и IL-7) не превышает 100 пг/мл. Оставшаяся часть цитокинов, ростовых факторов

и хемокинов детектируется в диапазоне от 100 до 10000 пг/мл. Среди них продукция IL-1ra, IFN γ , IL-10, G-CSF, PDGF, VEGF и Eotaxin превышает 1000 пг/мл.

В присутствии дексаметазона продукция не только TNF α , но и другого провоспалительного медиатора – IL-1 β , а также Th1-цитокинов (IFN γ , IL-2, IL-12) значимо снижалась. Характерно, что при этом дексаметазон не оказывал заметного влияния на секрецию IL-10, IL-1ra, IL-4 и IL-13, смещая тем самым баланс в сторону противовоспалительных/Th2-медиаторов. IFN-ДК, генерируемые в присутствии дексаметазона, отличались также более низкой продукцией хемокинов. Эти различия были достоверны в отношении MIP-1 α и RANTES и проявлялись в виде тенденции в отношении IP-10 и Eotaxin. Под влиянием дексаметазона регистрировался также отчетливый тренд на снижение продукции ростовых факторов (G-CSF, IL-7, FGF- β ,

PDGF), который в отношении VEGF достигал статистически значимого уровня.

Способность ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток в ответ на аллоантигены в СКЛ является интегральным показателем функциональной активности ДК, которая во многом детерминирована экспрессией различных ко-стимуляторных или коингибиторных молекул, а также балансом и уровнем продуцируемых цитокинов. Учитывая, что дексаметазон оказывал выраженный супрессорный эффект на созревание IFN-ДК, а также на продукцию ими провоспалительных и Th1-цитокинов, представлялось важным оценить, влияние дексаметазона на аллостимуляторную активность IFN-ДК в СКЛ. Из данных рисунка 2 видно, что по сравнению с контролем IFN-ДК, генерированные в присутствии дексаметазона, отличались 2-кратным снижением способности стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ. Поскольку ДК_{Инт} и ДК_{Дек} у каждого из обследованных доноров были тестированы в идентичных условиях, т.е. в СКЛ с одними и теми же клетками-респондерами, то выявленное снижение аллостимуляторной активности ДК_{Дек} не было связано с эффективностью распознавания CD4⁺Т-лимфоцитами аллоантигенов, представленных на HLA-DR⁺ДК. В то же время корреляционный анализ показал, что способность интактных IFN-ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ находится в прямой взаимосвязи с содержанием среди них CD83⁺ клеток ($r_s = 0,57$; $p = 0,04$), и в обратной – с количеством CD14⁺ и TLR2⁺ клеток ($r_s = -0,68$; $p = 0,005$ и $r_s = -0,65$; $p = 0,0005$ соответственно). С этой точки зрения низкая аллостимуляторная активность IFN-ДК_{Дек} во многом объясняется возрастанием среди них доли CD14⁺ и TLR2⁺ клеток и снижением относительного количества CD83⁺ДК (рис. 1).

В заключение, чтобы выяснить, влияет ли дексаметазон на способность IFN-ДК активировать Th1- и Th2-клетки, оценили содержание Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-6) цитокинов в супернатантах 5-суточной алло-СКЛ, индуцированной ДК_{Инт} и ДК_{Дек} (табл. 3). Видно, что в культурах МНК в отсутствие стимуляции аллоантигенами продукция IL-6 существенно выше, чем уровень секреции IFN γ (индекс соотношения IL-6/IFN γ составляет в среднем 42 расч. ед.). Культивирование МНК с аллогенными интактными IFN-ДК сопровождалось увеличением концентрации как IL-6, так и IFN γ . Уровень продукции IFN γ в алло-СКЛ увеличивался в среднем в 39 раз, что свидетельствовало о выраженной Th1-стимуляторной активности IFN-ДК, которые при этом стимулировали также и Th2-клетки, поскольку продукция IL-6 возрастала в сред-

нем в 13 раз. Под влиянием дексаметазона Th1-стимуляторная активность IFN-ДК практически полностью блокировалась, что проявлялось достоверным снижением концентрации IFN γ в среднем на 93% (с 1100 до 80 пг/мл, $p_U < 0,01$). Супрессорный эффект дексаметазона в отношении Th2-стимуляторной активности IFN-ДК был менее выраженным, поскольку продукция IL-6 снижалась только на 17% (с 10020 до 8320 пг/мл, $p_U < 0,05$). В результате индекс соотношения IL-6/IFN γ в культурах СКЛ, индуцированных IFN-ДК_{Дек}, возрастал практически в 15 раз (до 162 против 11 расч. ед., $p_U < 0,01$), свидетельствуя о доминировании Th2-поляризующей активности IFN-ДК под влиянием дексаметазона.

Обсуждение

В настоящем исследовании впервые охарактеризовано влияние дексаметазона на созревание и функции ДК, генерируемых в присутствии IFN α . Интерес к этим клеткам связан с тем, что интерфероны I типа являются мощными индукторами дифференцировки и созревания ДК [10], и такие ДК могут генерироваться *in vivo* при аутоиммунной патологии на фоне повышенного уровня интерферонов [3]. Соответственно, исследование их чувствительности к глюкокортикоидам представляет большой интерес как с точки зрения создания ДК-вакцин, так и раскрытия новых иммуноопосредованных механизмов действия глюкокортикостероидной терапии. Проведенные нами исследования продемонстрировали, что дексаметазон подавляет созревание IFN-ДК и усиливает экспрессию TLR2; угнетает продукцию провоспалительных/Th1-цитокинов (TNF α , IL-1 β , IL-2, IFN γ , IL-12) и хемокинов (MIP-1 α , RANTES); ингибирует аллостимуляторную активность ДК, а также блокирует Th1-стимуляторную активность, смещая баланс в сторону доминирования Th2-поляризующей активности IFN-ДК.

Исследования эффектов глюкокортикоидов на ДК, генерируемые из моноцитов в присутствии IL-4, показали, что глюкокортикоиды ингибируют NF- κ B зависимую дифференцировку и созревание IL4-ДК [14, 17, 21]. Такие «толерогенные» IL4-ДК характеризуются менее зрелым фенотипом, сниженной экспрессией ко-стимуляторных молекул, а также угнетением продукции провоспалительных (TNF α , IL-1 β) и Th1 (IL-12) цитокинов и повышенной продукцией IL-10 [21, 22, 31]; отличаются низкой аллостимуляторной активностью, что обусловлено повышенной экспрессией PD-L1 (B7-H1) и продукцией IL-10; не способны активировать Th1-ответ; индуцируют

анергию наивных Т-клеток и Т-клеток памяти и генерацию регуляторных T_H1-клеток [30, 32, 33].

Полученные нами результаты демонстрируют во многом сходные эффекты глюкокортикоидов на IFN α -индуцированные ДК. В то же время дексаметазон не оказывал значимого ингибирующего эффекта на экспрессию антигенов гистосовместимости (HLA-DR) и костимуляторных молекул (CD86) IFN-ДК и не вызывал повышения экспрессии коингибиторной молекулы PD-L1 (B7-H1), как это было выявлено в культурах ИЛ4-ДК [21, 31, 32]. Подобные расхождения могут быть обусловлены не столько особенностями IFN-ДК, сколько методическими различиями (доза дексаметазона, времени внесения глюкокортикоидов в культуру ДК, стадия зрелости ДК). Так, например, возрастание экспрессии PD-L1 было продемонстрировано в культурах незрелых ИЛ4-ДК при добавлении дексаметазона с начала культивирования клеток [32]. В то же время, при анализе LPS-активированных ИЛ4-ДК и более позднем внесении дексаметазона, стимулирующий эффект дексаметазона на экспрессию PD-L1 не выявлялся [8, 29].

Несмотря на отсутствие значимого эффекта на экспрессию PD-L1, дексаметазон в 2 раза усиливал экспрессию TLR2 в культурах IFN-ДК. Аналогичный эффект глюкокортикоидов описан в отношении ИЛ4-ДК [5, 24]. Согласно данным литературы, высокая экспрессия TLR-2 на ДК ассоциирована с высокой продукцией ИЛ-10 и низкой секрецией TNF α и IFN γ при стимуляции LPS, что позволяет рассматривать данную молекулу в качестве маркера толерогенной активности ДК [5]. Полученные нами результаты подтвердили сопряженность высокой экспрессии TLR-2 со снижением провоспалительных и Th1 цитокинов LPS-активированными IFN-ДК, однако не выявили ассоциации с усилением продукции ИЛ-10. Данные о влиянии глюкокортикоидов на продукцию ИЛ-10 неоднозначны. Так, ряд авторов демонстрируют стимулирующий эффект дексаметазона на продукцию ИЛ-10 дендритными клетками [4, 22, 33], тогда как по данным других, глюкокортикоиды не оказывают значимого эффекта на секрецию ИЛ-10 [21, 29, 31]. Возможно, отсутствие стимулирующего действия дексаметазона на продукцию ИЛ-10 связано с особенностями генерируемых в присутствии интерфе-

рона-альфа ДК, которые исходно отличаются более высокой продукцией ИЛ-10 по сравнению с ИЛ4-ДК [16]. Схожие данные, о том, что толерогенная активность IFN-ДК не связана с усилением продукции ИЛ-10, были продемонстрированы в культурах ДК, генерируемых в присутствии активных метаболитов витамина D3 [9]. Так или иначе, между содержанием TLR2-позитивных IFN-ДК и их аллостимуляторной активностью выявлялась значимая обратная корреляционная связь, подтверждающая роль данной молекулы в реализации толерогенной активности ДК.

Одним из возможных механизмов ингибирующего действия дексаметазона на способность IFN-ДК стимулировать пролиферацию Т-клеток и активировать Th1-ответ может быть снижение продукции IFN-ДК провоспалительных и Th1-цитокинов, необходимых для поддержания пролиферации Т-клеток. Поскольку мы не выявили стимулирующего действия дексаметазона на экспрессию PD-L1 и продукцию ИЛ-10 в культурах IFN-ДК, вопрос о способности этих клеток индуцировать анергию/апоптоз Т-клеток, а также генерацию регуляторных Т-клеток, остается открытым и требует дальнейших исследований. Тем не менее, данные об ингибирующем влиянии дексаметазона на продукцию IFN-ДК хемокинов (MIP-1 α и RANTES) позволяет предполагать, что эти клетки могут быть дефектны в отношении рекрутирования Т-лимфоцитов. Известно, что RANTES и MIP-1 α являются лигандами для CCR5, который экспрессируется Th1-клетками, а также антигенспецифическими CD8 эффекторными Т-лимфоцитами и Т-клетками памяти [7, 27]. MIP-1 α является также лигандом для CCR3, экспрессируемого Th2-клетками [27]. Таким образом, снижение продукции этих хемокинов может негативным образом сказываться на способности ДК к рекрутированию и активации хелперных и эффекторных Т-лимфоцитов.

В целом полученные данные свидетельствуют о том, что ДК, генерируемые в присутствии интерферона-альфа, чувствительны к толерогенному действию дексаметазона и, следовательно, могут опосредовать иммуномодулирующий эффект глюкокортикоидной терапии, а также рассматриваться в качестве новых кандидатов для разработки толерогенных лечебных ДК-вакцин при аутоиммунной патологии.

Список литературы / References

1. Bakdash G., Sittig S.P., van Dijk T., Figdor C.G., de Vries I.J. The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II. *Front Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 53.
2. Biggioggero M., Gabbriellini L., Meroni P.L. Type I interferon therapy and its role in autoimmunity. *Autoimmunity*, 2010, Vol. 43, no. 3, pp. 248-254.
3. Blanco P., Palucka A.K., Gill M., Pascual V., Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN- α in systemic lupus erythematosus. *Science*, 2001, Vol. 294, no. 5546, pp. 1540-1543.

4. Canning M.O., Grotenhuis K., de Wit H.J., Drexhage H.A. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur. J. Endocrinol.*, 2000, Vol. 143, no. 5, pp. 687-695.
5. Chamorro S. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 2984-2994.
6. Della Bella S., Nicola S., Riva A., Biasin M., Clerici M., Villa M.L. Functional repertoire of dendritic cells generated in granulocyte macrophage-colony-stimulating factor and interferon- α . *J. Leukoc. Biol.*, 2004, Vol. 75, no. 1, pp. 106-116.
7. Fukada K., Sobao Y., Tomiyama H., Oka S., Takiguchi M. Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 5, pp. 2225-2232.
8. García-González P., Morales R., Hoyos L., Maggi J., Campos J., Pesce B., Gárate D., Larrondo M., González R., Soto L., Ramos V., Tobar P., Molina M.C., Pino-Lagos K., Catalán D., Aguillón J.C. A short protocol using dexamethasone and monophosphoryl lipid A generates tolerogenic dendritic cells that display a potent migratory capacity to lymphoid chemokines. *J. Transl. Med.*, 2013, Vol. 11, p. 128.
9. Gauzzi M.C., Maghazachi G., Belardelli F., Adorini L., Jin S.Y., Wang L., Daniel K.C., Maghazachi A.A., Belardelli F., Adorini L., Gessani S. Suppressive effect of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 on type I IFN-mediated monocyte differentiation into dendritic cells: impairment of functional activities and chemotaxis. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 1, pp. 270-276.
10. Gessani S., Conti L., Del Cornò M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 1696-1723.
11. Gordon J.R., Ma Y., Churchman L., Gordon S.A., Dawicki W. Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases. *Front Immunol.*, 2014, Vol. 5, p. 7.
12. Gottenberg J.E., Chiochia G. Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity. *Biochimie*, 2007, Vol. 89, no. 6-7, pp. 856-871.
13. Harry R.A., Anderson A.E., Isaacs J.D., Hilkens C.M. Generation and characterization of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 11, pp. 2042-2050.
14. Hilkens C.M.U., Isaacs J.D. Tolerogenic dendritic cells in clinical practice. *Open Arthritis Journal*, 2010, Vol. 3, pp. 8-12.
15. Hubo M., Trinschek B., Kryczanowsky F., Tuettenberg A., Steinbrink K., Jonuleit H. Costimulatory molecules on immunogenic versus tolerogenic human dendritic cells. *Front Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 82.
16. Leplina O.Y., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon α induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine*, 2015, Vol. 71, no. 1, pp. 1-7.
17. Matasic R., Dietz A.B., Vuk-Pavlovic S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J. Leukoc Biol.*, 1999, Vol. 66, no. 6, pp. 909-914.
18. Matyszak M.K., Citterio S., Rescigno M., Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.*, 2000, Vol. 30, no. 4, pp. 1233-1242.
19. Paquette R.L., Hsu N.C., Kiertscher S.M., Park A.N., Tran L., Roth M.D., Glaspy J.A. Interferon- α and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor differentiate peripheral blood monocytes into potent antigen-presenting cells. *J. Leukoc. Biol.*, 1998, Vol. 64, no. 3, pp. 358-367.
20. Peña C., Gárate D., Contreras-Levicoy J., Aravena O., Catalán D., Aguillón J.C. Dexamethasone preconditioning improves the response of collagen-induced arthritis to treatment with short-term lipopolysaccharide-stimulated collagen-loaded dendritic cells. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, Article ID 296031.
21. Piemonti L., Monti P., Allavena P., Sironi M., Soldini L., Leone B.E., Soggi C., Di Carlo V. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J. Immunol.*, 1999, Vol. 162, no. 11, pp. 6473-6481.
22. Rea D., van Kooten C., van Meijgaarden K.E., Melief C.J.M., Offringa R. Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen presenting cells that secrete IL-10. *Blood*, 2000, Vol. 95, no. 10, pp. 3162-3167.
23. Rönnblom L., Eloranta M.L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr Opin Rheumatol.*, 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 248-253.
24. Rozkova D., Horvath R., Bartunkova J., Spisek R. Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite up-regulation of Toll-like receptors. *Clin. Immunol.*, 2006, Vol. 120, no. 3, pp. 260-271.
25. Santini S.M., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., di Pucchio T., Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in hu-pbl-scid mice. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 10, pp. 1777-1788.
26. Steinman R.M., Hawiger D., Liu K., Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Iyoda T., Ravetch J., Dhodapkar M., Inaba K., Nussenzweig M. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.*, 2003, Vol. 987, no. 1, pp. 15-25.
27. Syrbe U., Siveke J., Hamann A. Th1/Th2 subsets: distinct differences in homing and chemokine receptor expression? *Springer Semin Immunopathol.*, 1999, Vol. 21, no. 3, pp. 263-285.

28. Thurner B., Röder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kämpgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical application. *J. Immunol. Methods*, 1999, Vol. 223, no. 1, pp. 1-15.

29. Unger W.W., Laban S., Kleijwegt F.S., van der Slik A.R., Roep B.O. Induction of T-reg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 11, pp. 3147-3159.

30. Van Kooten C., Stax A.S., Woltman A.M., Gelderman K.A. Handbook of experimental pharmacology "dendritic cells": the use of dexamethasone in the induction of tolerogenic DCs. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, Vol. 188, pp. 233-249.

31. Woltman A.M., de Fijter J.W., Kamerling S.W., Paul L.C., Daha M.R., van Kooten C. The effect of calcineurin inhibitors and corticosteroids on the differentiation of human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.*, 2000, Vol. 30, no. 7, pp. 1807-1812.

32. Woltman A.M., Vander Kooij S.W., De Fijter J.W., van Kooten C. Maturation-resistant dendritic cells induce hyporesponsiveness in alloreactive CD45RA⁺ and CD45RO⁺T-cell populations. *Am. J. Transplant.*, 2006, Vol. 6, no. 11, pp. 2580-2591.

33. Xia C.Q., Peng R., Beato F., Clare-Salzler M.J. Dexamethasone induces IL-10-producing monocyte-derived dendritic cells with durable immaturity. *Scand. J. Immunol.*, 2005, Vol. 62, no. 1, pp. 45-54.

Авторы:

Курочкина Ю.Д. — аспирант лаборатории клеточной иммунотерапии, врач-ревматолог клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

Тихонова М.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Тыринова Т.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Баторов Е.В. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории клеточной иммунотерапии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Сизиков А.Э. — к.м.н., заведующий отделением ревматологии Клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

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

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

Authors:

Kurochkina Yu.D., Postgraduate Student, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Physician (Rheumatology), Immunopathology Clinics, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Tikhonova M.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Tyrinova T.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Batorov E.V., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Sizikov A.E., PhD (Medicine), Head, Rheumatology Department, Immunopathology Clinics, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

Поступила 23.03.2016
Принята к печати 31.05.2016

Received 23.03.2016
Accepted 31.05.2016

ЛОКАЛЬНАЯ И СИСТЕМНАЯ ПРОДУКЦИЯ VEGF-A ПРИ ОСЛОЖНЕННОЙ ПРОЛИФЕРАТИВНОЙ ДИАБЕТИЧЕСКОЙ РЕТИНОПАТИИ

Нероев В.В., Зайцева О.В., Балацкая Н.В., Курчаева З.В.

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

Резюме. Изучено содержание VEGF-A в сыворотке крови, слезной жидкости, стекловидном теле пациентов при различных клинических вариантах осложненной пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР). Обследованы 50 больных сахарным диабетом (I, II тип), 12 пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки и 15 здоровых лиц. Выявлено, что осложненная ПДР ассоциируется с повышением уровня VEGF-A в сыворотке крови и слезной жидкости пациентов по сравнению с таковым больных со стабильной ПДР и здоровых лиц, а также высоким содержанием VEGF-A в стекловидном теле, достоверно превосходящим значения концентрации этого цитокина при регматогенной отслойке сетчатки. Наиболее тяжелые клинические проявления осложненной ПДР, интраоперационные геморрагические осложнения ассоциировались с резким повышением VEGF-A в сыворотке крови и стекловидном теле, отражавшим нарушения на локальном и системном уровнях.

Ключевые слова: пролиферативная диабетическая ретинопатия, патогенез, витреоретинальная хирургия, VEGF-A

LOCAL AND SYSTEMIC VEGF-A PRODUCTION IN COMPLICATED PROLIFERATIVE DIABETIC RETINOPATHY

Neroev V.V., Zaytseva O.V., Balatskaya N.V., Kurchaeva Z.V.

H. Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Abstract. VEGF-A contents was studied in blood serum, lacrimal fluid, and vitreous body of patients with different clinical forms of complicated proliferative diabetic retinopathy (PDR). The study included 50 patients with diabetes mellitus (type I, II), twelve patients with rhegmatogenous retinal detachment and fifteen healthy individuals. Complicated PDR was shown to be associated with higher levels of VEGF-A in blood serum and lacrimal fluid of these patients as compared to the cases of stable PDR and healthy individuals, as well as increased VEGF-A concentrations in vitreous humor. Concentrations of this cytokine in vitreous body proved to be significantly exceeded those in rhegmatogenous retinal detachment. Most severe clinical manifestations in complicated PDR and intraoperative hemorrhagic complications were associated with sharp VEGF-A increase in blood serum and vitreous humor, thus reflecting certain disturbances at local and systemic levels.

Keywords: proliferative diabetic retinopathy, pathogenesis, vitreoretinal surgery, VEGF-A

Адрес для переписки:

Курчаева Зайнап Вахмурадовна
ФГБУ «Московский научно-исследовательский
институт глазных болезней им. Гельмгольца»
Министерства здравоохранения РФ
105062, Россия, Москва,
ул. Садовая-Черногрозская, 14/19.
Тел.: 8 (925) 133-20-00.
E-mail: Kurchaeva1608@mail.ru

Address for correspondence:

Kurchaeva Zainap V.
H. Helmholtz Research Institute of Eye Diseases
105062, Russian Federation, Moscow, Sadovaya-
Chernogryazskaya str., 14/19.
Phone: 7 (925) 133-20-00.
E-mail: Kurchaeva1608@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Нероев, О.В. Зайцева, Н.В. Балацкая, З.В. Курчаева
«Локальная и системная продукция VEGF-A при
осложненной пролиферативной диабетической
ретинопатии» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18,
№ 4. С. 357-364. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-357-364

© Нероев В.В. и соавт., 2016

For citation:

V.V. Neroev, O.V. Zaytseva, N.V. Balatskaya, Z.V. Kurchaeva
“Local and systemic VEGF-A production in complicated
proliferative diabetic retinopathy”, *Medical Immunology (Russia)/*
Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 357-364.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-357-364

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-357-364>

Введение

Глазные осложнения сахарного диабета (СД) представляют серьезную медико-социальную проблему, являясь основной причиной слепоты и слабовидения в возрастной группе до 50 лет. Одной из частых причин потери зрения у пациентов с диабетическим поражением глаз является прогрессирование патологического процесса до пролиферативной диабетической ретинопатии (ПДР) с выраженной фиброваскулярной пролиферацией, осложненной тракционной отслойкой сетчатки и/или гемофтальмом [1, 2, 5].

На сегодняшний день основная роль в иммунопатогенезе глазных микрососудистых изменений при СД отводится сосудистому эндотелиальному фактору роста (vascular endothelial growth factor-A, VEGF-A). Термин «эндотелиальный фактор роста сосудов» был впервые использован в 1982 году при изучении специфической митогенной активности эндотелия сетчатки телят [6]. Наибольшее физиологическое значение для регуляции пролиферации и формирования эндотелиальных клеток в процессе ангиогенеза у человека имеет VEGF-A, являющийся гомодимерным гликопротеином, состоящим из двух субъединиц с молекулярной массой по 23 кДа [7].

Синтез VEGF-A активируется в условиях гипоксии как за счет усиления транскрипции гена, так и путем увеличения в 3–8 раз периода полураспада мРНК этого ростового фактора [8, 9]. В норме базовая экспрессия мРНК VEGF-A была обнаружена практически во всех тканях глаза, с максимальной активностью в цилиарном теле, конъюнктиве, сетчатке, пигментном эпителии, хориоиде и хрусталике [6]. В сетчатке синтез этого цитокина осуществляют перициты, эндотелий сосудов, мюллеровские и ганглиозные клетки [10, 11]. Рецепторы к VEGF-A были обнаружены на эндотелии и перицитах ретинальных и хориоидальных сосудов, глиальных клетках сетчатки, пигментном эпителии, на клетках эндотелия роговицы [12].

К настоящему времени накоплено немало количество экспериментальных данных, подтверждающих проангиогенные свойства VEGF-A и его влияние на проницаемость стенок сосудов сетчатки. В культуре клеток эндотелия VEGF-A проявлял свойства митогена, стимулируя их миграцию и образование структур, подобных сосудам, так называемый «ангиогенез *in vitro*» [3, 6]. Благодаря этим свойствам он способен играть значительную роль в патогенезе ДР.

Участие VEGF-A в поражении сетчатки при СД было продемонстрировано на экспериментальных моделях ДР у животных [13, 14]. Интравитреальное введение рекомбинантного VEGF-A вызывало разнообразные сосудистые изменения, включавшие окклюзию капилляров, гиперплазию эндотелия сосудов, повышение

проницаемости ретинальных сосудов, появление отека сетчатки, кровоизлияний, четкообразных вен, микроаневризм, неоваскуляризации сетчатки и радужки с развитием неоваскулярной глаукомы и тракционной отслойки сетчатки у здоровых приматов [15, 16] и кроликов [17]. Развитие преретинальной неоваскуляризации зависело от дозы вводимого VEGF-A [18]. Такие изменения являются характерными для различных стадий развития ДР.

Серия клинических исследований роли VEGF-A при ПДР началась в середине 1990-х годов. Было выявлено значительное повышение уровня VEGF-A в пробах стекловидного тела (СТ) и водянистой влаги у пациентов с ПДР в сравнении с показателями пациентов без ДР или с непролиферативной либо препролиферативной стадиями заболевания [19, 20].

Последующие исследования продемонстрировали увеличение внутриглазной концентрации VEGF-A при непролиферативной ДР, а также при отсутствии клинических признаков поражения глаз у больных СД в сравнении с показателями пациентов без СД [21, 22]. Повышение содержания VEGF-A во влаге передней камеры и СТ обнаруживались у пациентов с различными стадиями ДР. Более высокие уровни фактора роста в СТ определялись в случаях макулярного отека [23, 24]. Максимальная концентрация VEGF-A отмечалась у пациентов с вторичной неоваскулярной глаукомой [25].

Показано, что содержание ростового фактора во внутриглазных средах отражает тяжесть пролиферативного процесса в глазу и не коррелирует с его концентрацией в плазме крови [24, 26]. Согласно исследованию Shinoda K. и соавторов, концентрация VEGF-A во влаге передней камеры пациентов с ПДР не зависела от типа СД, длительности заболевания, способа контроля гликемии, уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), наличия артериальной гипертензии или нефропатии [27].

Ряд исследователей предложили использовать внутриглазные показатели VEGF-A в качестве критериев прогнозирования операции. По мнению Wang J. и соавторов, значение содержания VEGF-A в СТ может быть использовано для прогноза результата витрэктомии у больных с тяжелыми формами ПДР [28]. Эти данные в дальнейшем подтвердил корреляционный анализ, выявивший сильные взаимосвязи между уровнем VEGF-A, балансом проангиогенных/антиангиогенных факторов в витреальной полости больных с ПДР и исходами интравитреальных вмешательств [4, 29, 30].

Таким образом, экспериментальными и клиническими исследованиями доказано, что VEGF-A играет важную роль в патогенезе ДР. Дальнейшее изучение продукции фактора роста эндотелия сосудов при различных клинических

особенностях заболевания позволит более глубоко понять механизмы развития этого тяжелого осложнения СД и оптимизировать тактику ведения пациентов.

Цель работы: изучение уровня VEGF-A в сыворотке крови (СК), слезной жидкости (СЖ) и стекловидном теле (СТ) при различных клинических проявлениях осложненной ПДР.

Материалы и методы

Обследовано 50 больных с СД 1-го и 2-го типа, 12 пациентов с регматогенной отслойкой сетчатки (РОС) и 15 практически здоровых лиц. Всем пациентам проводилось стандартное офтальмологическое обследование в условиях отдела по изучению патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России, включавшее визометрию (без коррекции и с максимальной коррекцией), тонометрию, биомикроскопию, осмотр глазного дна в условиях миопии, ультразвуковое А-В сканирование, фундусфоторегистрацию, оптическую когерентную томографию сетчатки, флуоресцентную ангиографию (по показаниям).

Основную клиническую группу составили 39 пациентов (25 женщин и 14 мужчин) с осложненной ПДР в возрасте от 30 до 73 лет (в среднем $54,6 \pm 9,37$ года). СД 1 типа страдали 11 пациентов, СД 2 типа – 28 пациента. Длительность заболевания СД колебалась от 3 до 35 лет (в среднем $16,6 \pm 7,26$ года). Диагноз ПДР был установлен от 1 года до 20 лет назад (в среднем $4,14 \pm 2,64$ года). Уровень HbA1c колебался от 4,65% до 12,2% (в среднем $7,84 \pm 1,3\%$). При этом у 11 пациентов (28%) показатель HbA1c был ниже 6,5% (ниже целевого значения), у 28 (72%) – выше 6,5% [29].

У всех пациентов этой группы по данным клинического обследования выявлялись организованный гемофтальм и/или тракционная отслойка сетчатки как минимум на одном глазу на фоне тяжелых диабетических изменений сетчатки. Осложненный характер ПДР на обоих глазах был отмечен у 27 больных (69%). Хирургическое вмешательство, включавшее микроинвазивную субтотальную витрэктомия, швартэктомия, эндолазеркоагуляцию сетчатки, эндотампонаду силиконовым маслом, проводили на 32 глазах по стандартной трехпортовой методике. Оценивалась выраженность геморрагических осложнений в ходе хирургических манипуляций. За 7 дней до операции 7 пациентам проводилось интравитреальное введение препарата ранибизумаб (луцентис) по стандартной методике в дозе 0,05 мл с целью снижения активности новообразованных сосудов в составе фиброглияльных мембран и риска интраоперационных осложнений. Манипуляция проводилась на основании одобрения Локального этического

комитета, после подписания пациентом информированного согласия.

С целью анализа особенностей содержания VEGF-A в разных биологических жидкостях были сформированы 2 группы сравнения. Группу для сравнительной оценки уровней VEGF-A в СК и СЖ составили 11 пациентов (8 женщин и 3 мужчины) со стабильным течением ПДР в возрасте от 40 до 67 лет (в среднем $55,0 \pm 6,66$ года). На обоих глазах этих пациентов ранее была проведена панретинальная лазеркоагуляция в максимальном объеме. На момент обследования зон активной неоваскуляризации по результатам флуоресцентной ангиографии обнаружено не было, отсутствовали признаки диабетического макулярного отека. В этой группе СД 1 типа страдали 4 пациента, СД 2 типа – 7 пациентов. Длительность заболевания СД колебалась от 9 до 15 лет (в среднем $11,6 \pm 2,2$ года). Диагноз ПДР был установлен от 1 до 5 лет назад (в среднем $2,67 \pm 0,89$ года). HbA1c отмечался на уровне от 6% до 11,03% (в среднем $7,25 \pm 2,13\%$). У 7 пациентов (64%) показатель HbA1c был ниже 6,5%, у 4 (36%) – выше 6,5%. Группу для сравнительной оценки уровня VEGF-A в СТ составили 12 пациентов (5 женщин и 7 мужчин, средний возраст $47,3 \pm 9,4$ года) без СД, которым было проведено витреоретинальное хирургическое вмешательство по поводу РОС. В контрольную группу вошли 15 практически здоровых лиц (11 женщин и 4 мужчины) в возрасте от 36 до 67 лет (в среднем $49,6 \pm 6,0$ года) без значимой офтальмопатологии, не страдающих СД, а также сердечно-сосудистыми заболеваниями в стадии суб- и декомпенсации.

Иммунологические исследования проводилось на базе Отдела иммунологии и вирусологии ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Минздрава России «Уровень VEGF-А определяли в СК, СЖ и СТ пациентов с осложненной ПДР, СТ пациентов с РОС, СК и СЖ пациентов со стабильным течением ПДР и практически здоровых людей. Забор биологических жидкостей проводился с согласия пациента после разъяснения целей исследования. Взятие проб СК и СЖ осуществляли до каких-либо манипуляций, пробы СТ забирались до витреоректомии. Все биопробы хранились при температуре -70°C . Концентрацию VEGF-A определяли в рамках мультиплексного анализа на анализаторе MAGPIX («Luminex Corporation», США) в программе Luminex xPONENT 3.1, с помощью наборов (ProcartaPlex «eBioscience», Австрия). Полученные результаты выражали в пг/мл.

Статистическую обработку данных проводили с применением пакета прикладной программы BIOSTAT. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05.

Результаты и обсуждение

VEGF-A выявлялся во всех исследованных пробах биологических жидкостей пациентов и лиц контрольной группы.

В СК практически здоровых людей ($n = 15$) VEGF-A определялся на уровне от 38,7 до 283,8 пг/мл (в среднем $90,0 \pm 24,5$ пг/мл). У пациентов со стабильным течением ПДР ($n = 11$) уровень VEGF-A в СК существенно не отличался от показателей здоровых людей, колебался в пределах от 66,3 до 215,2 пг/мл и составил в среднем $140,5 \pm 64,2$ пг/мл (рис. 1).

В то же время среди пациентов с осложненной ПДР ($n = 39$) отмечались значительные колебания показателя сывороточного VEGF-A — от 20,3 до 851,5 пг/мл при среднем значении $226,4 \pm 146,3$ пг/мл, достоверно превышающим таковое в группе здоровых людей ($p < 0,01$).

Сравнительный анализ концентраций VEGF-A в СК был проведен в подгруппах пациентов в зависимости от особенностей клинической картины заболевания. Выявлено, что в случаях наиболее тяжелых двусторонних проявлений осложненной ПДР — гемофтальм и тракционная отслойка сетчатки на обоих глазах ($n = 9$) средние значения содержания VEGF-A достигли максимальной отметки $399,8 \pm 206,7$ пг/мл (колебания в пределах от 253,2 до 851,5 пг/мл). У пациентов с умеренными проявлениями осложненной ПДР (гемофтальм и/или тракционная отслойка сетчатки на одном глазу, изолированный гемофтальм или фиброглияльная пролиферация с тракционным синдромом на двух глазах) ($n = 30$) уровень сывороточного VEGF-A был достоверно ниже и составил в среднем $190,0 \pm 122,7$ пг/мл ($p = 0,01$; диапазон колебаний от 20,3 до 590,0 пг/мл).

Таким образом, системный показатель VEGF-A отчетливо коррелировал с тяжестью проявления осложнений ПДР. Наиболее тяжелые двусторонние микрососудистые ретинальные изменения ассоциировались с достоверно повышенным содержанием сывороточного VEGF-A,

что свидетельствует о системном характере изменений.

В СЖ лиц контрольной группы без СД и глазной патологии ($n = 15$) уровень VEGF-A находился в диапазоне от 214,5 до 1336,3 пг/мл (в среднем $775,4 \pm 560$ пг/мл). У пациентов с СД значения роста фактора достоверно превышали показатели здоровых людей ($p < 0,01$): при стабильном течении ПДР ($n = 11$) VEGF-A выявлялся в пределах от 974,4 до 3675,4 пг/мл ($2257,9 \pm 945,0$ пг/мл); при осложненной ПДР ($n = 58$) уровень VEGF-A в СЖ определялся на еще более высокой отметке — в среднем $3229,6 \pm 753,8$ пг/мл при колебаниях от 710,9 до 4807,9 пг/мл, достоверно превышая показатели пациентов со стабильным течением ПДР ($p < 0,01$) (рис. 1).

При анализе в подгруппах с различными клиническими проявлениями осложненной ПДР выявлено, что концентрации VEGF-A в СЖ глаз с гемофтальмом и сочетанием гемофтальма и тракционной отслойкой достоверно превышали таковые в подгруппе с изолированной тракционной отслойкой сетчатки ($p < 0,05$) (табл. 1). При этом уровень VEGF-A был максимальным в случаях самой тяжелой клинической картины заболевания — при сочетании гемофтальма и тракционной отслойки сетчатки. Различий содержания VEGF-A в зависимости от степени интраокулярной фиброглияльной пролиферации не выявлено.

В случаях обильной васкуляризации пролиферативной ткани (фиброваскулярная ткань) уровень VEGF-A в СЖ оказался достоверно ($p < 0,05$) повышенным по сравнению с таковым СЖ глаз с клинически бессосудистой фиброглияльной тканью. Содержание VEGF-A 3490 пг/мл и выше достоверно ассоциировалось с наличием в глазу обильно васкуляризированной пролиферативной ткани, что может быть использовано в качестве прогностического критерия при непрозрачных оптических средах.

Таким образом, в результате исследования выявлено, что осложненная ПДР ассоциируется

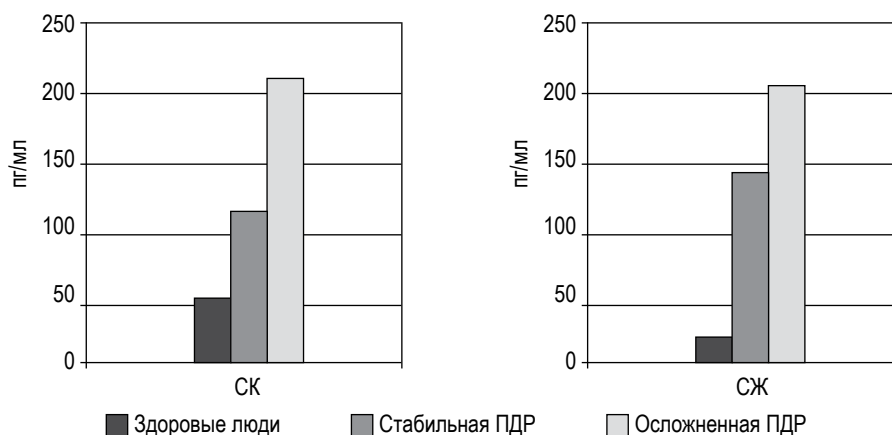


Рисунок 1. Уровни VEGF-A (пг/мл) в СК и СЖ здоровых лиц, пациентов со стабильным течением ПДР и осложненной ПДР

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ VEGF-A (пг/мл) В СЖ И СТ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЯХ ОСЛОЖНЕННОЙ ПДР (M±m)

Особенности клинической картины осложненной ПДР		Уровень VEGF-A	
		СЖ	СТ
Клинические проявления осложненной ПДР	Организованный гемофтальм	3450,3±704,1* (n = 18)	1400,2±391,3* (n = 5)
	Тракционная отслойка сетчатки	2693,2±838,5 (n = 18)	535,4±235,5 (n = 10)
	Сочетание гемофтальма и тракционной отслойки сетчатки	3715,5±494,7* (n = 22)	1316,2±640,5* (n = 17)
Степень фиброглияльной пролиферации	Глиоз 2-3 степени	3291,1±693,3 (n = 12)	1413,4±638,0 (n = 5)
	Глиоз 4 степени	3322,8±713,8 (n = 28)	959,1±309,3 (n = 22)
Васкуляризация фиброглияльной ткани	Фиброваскулярная пролиферативная ткань	3651,7±570,8** (n = 24)	1553,6±413,1** (n = 17 из 19)
	Фиброглияльная пролиферативная ткань	2684,2±806,4 (n = 16)	647,5±381,2 (n = 8)

Примечание. * – различие достоверно относительно показателя в подгруппе с тракционной отслойкой сетчатки, $p < 0,05$;
** – различие достоверно относительно показателя в подгруппе с фиброглияльной тканью, $p < 0,05$;
n – число проб биологических жидкостей.

с резко повышенным содержанием VEGF-A в СЖ пациентов. Достоверно более высокие уровни цитокина в СЖ глаз с гемофтальмом, а также в случаях фиброваскулярной пролиферации, вероятно, связаны с участием VEGF-A в неоангиогенезе.

В СТ пациентов группы сравнения с РОС (n = 12) VEGF-A выявлялся в пределах от 17,76 до 619,86 пг/мл (в среднем 205,6±175,0 пг/мл). В СТ глаз, прооперированных по поводу осложненной ПДР (n = 32) без предварительного введения лущентиса, уровень VEGF-A оказался достоверно выше (1151,6±553,7 пг/мл, $p < 0,01$) при значительном размахе от 81,77 до 2473,18 пг/мл. В подгруппе пациентов (n = 7) с предварительным введением антиангиогенного препарата VEGF-A выявлялся в СТ на достоверно более низком уровне – 617,2±213,9 пг/мл ($p < 0,05$), показатель, однако, превышал уровни в глазах с РОС.

При индивидуальном сравнении было обнаружено, что у каждого пациента с осложненной ПДР уровень VEGF-A в СТ превышал показатель в СК, что свидетельствует о его локальной продукции тканями глаза.

Дальнейший сравнительный анализ интраокулярных уровней VEGF-A в подгруппах с различными особенностями клинической картины заболевания, а также при различной выраженности интраоперационных геморрагических осложнений был проведен только среди пациентов без предварительной антиангиогенной терапии.

Средние уровни VEGF-A в СТ при различных клинических проявлениях заболевания представлены в таблице 1. Достоверно повышенные кон-

центрации VEGF-A в СТ отмечены в подгруппах с гемофтальмом; сочетанием гемофтальма и тракционной отслойки в сравнении с показателями подгруппы с изолированной тракционной отслойкой сетчатки ($p < 0,01$).

В СТ 17 из 19 глаз с активной осложненной ПДР (фиброваскулярная пролиферативная ткань) выявлен максимальный уровень VEGF-A, достоверно превышающий таковой в СТ глаз с клинически бессосудистой фиброглияльной тканью ($p < 0,01$). В то же время в двух пробах СТ глаз с наиболее тяжелой клинической картиной (массивной васкуляризацией пролиферативной ткани, субтотальной отслойкой сетчатки, рубецом радужки) уровень VEGF-A оказался низким (81,8 и 112,3 пг/мл).

Таким образом, осложненная ПДР ассоциируется с достоверно повышенным содержанием VEGF-A в СТ по сравнению с РОС. Максимальные интраокулярные уровни цитокина отмечены в случаях гемофтальма и массивной васкуляризации пролиферативной ткани, что подтверждает участие VEGF-A в патологическом внутриглазном неоангиогенезе. В то же время минимальные концентрации VEGF-A в 2-х пробах СТ глаз с наиболее тяжелой клинической картиной активной осложненной ПДР могут отражать срыв иммунорегуляции.

Средние показатели VEGF-A в биологических жидкостях пациентов при различных особенностях течения основного заболевания (СД) представлены в таблице 2.

Статистически значимой зависимости содержания VEGF-A в СК, СЖ и СТ от пола и возраста пациентов, длительности заболевания СД,

особенностей терапии, показателей липидного обмена выявлено не было. При этом замечены достоверно более высокие показатели VEGF-A в СЖ пациентов с СД 2 типа и при уровне HbA1c выше целевого значения.

Ретроспективно был проведен анализ содержания VEGF-A в биологических жидкостях в зависимости от особенностей течения витреоретинального хирургического вмешательства (табл. 3). Пациенты были разделены на две подгруппы в зависимости от выраженности интраоперационных геморрагических осложнений: 1 – с наличием интраоперационной продолжительной геморрагической активности в процессе отсепаровки фиброглиальных мембран, затрудняющей проведение операции (9 глаз), 2 – с умеренной геморрагической активностью, не влияющей на ход операции (23 глаза).

Выраженные интраоперационные геморрагические осложнения отмечались у пациентов с исходно достоверно повышенным сывороточным содержанием VEGF-A, выше 300 пг/мл ($p < 0,05$), а также в большинстве случаев ассоциировались с достоверно высоким уровнем VEGF-A в СТ ($p < 0,05$). В то же время осложненное течение операции отмечено в двух глазах с исходно минимальным содержанием VEGF-A в СТ.

Выводы

Таким образом, показано, что осложненные формы ПДР ассоциируются с достоверно повышенным содержанием ангиогенного фактора роста в СК и СЖ пациентов.

Максимально высокие локальные концентрации VEGF-A (СЖ), выявленные при гемофтальме и в случаях активной фиброваскулярной пролиферации, свидетельствуют об участии фактора

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ VEGF-A (пг/мл) В СК, СЖ И СТ ПАЦИЕНТОВ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ОСОБЕННОСТЯХ ТЕЧЕНИЯ СД ($M \pm m$)

		Уровень VEGF-A		
Особенности течения СД		СК	СЖ	СТ
Тип	СД 1 типа	271±111,1 (n = 11)	2475±1131,3 (n = 14)	955,3±582,4 (n = 8)
	СД 2 типа	219,3±155,6 (n = 28)	3425,4±641,5* (n = 44)	1176,2±547,4 (n = 24)
Инсулинопотребность	Инсулинзависимый СД	203,3±111,6 (n = 22)	3253,6±656,5 (n = 37)	1075,4±487,2 (n = 20)
	Инсулиннезависимый СД	333,1±310 (n = 17)	3741,2±463,6 (n = 21)	1358,4±743,1 (n = 12)
Длительность заболевания	Менее 10 лет	295,1±189,3 (n = 13)	3453,6±529,3 (n = 18)	1020±484,4 (n = 10)
	Более 10 лет	242±178,2 (n = 26)	3357,1±725,6 (n = 40)	1206,7±518,7 (n = 22)
Уровень HbA1c	Ниже целевого значения	268,7±159,4 (n = 11)	2546,3±1364,6 (n = 15)	1343,9±484,8 (n = 9)
	Выше целевого значения	214,9±141,3 (n = 28)	3506,7±528* (n = 43)	1079±541,1 (n = 23)

Примечание. * – различие достоверно относительно аналогичного показателя в подгруппе, $p < 0,05$;
n – число проб биологических жидкостей.

ТАБЛИЦА 3. УРОВЕНЬ VEGF-A (пг/мл) В СК, СЖ И СТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ХАРАКТЕРА ТЕЧЕНИЯ ХИРУРГИЧЕСКОГО ВМЕШАТЕЛЬСТВА ($M \pm m$; min-max)

Течение операции	Уровень VEGF-A		
	СК	СЖ	СТ
Выраженные геморрагические осложнения (n = 9)	383,5±234,2* (110,1-851,5)	3223,6±1206,0 (710,9-3995,6)	1858,6±213,4* (n = 7 из 9), (81,7-2071,1)
Отсутствие значимых геморрагических осложнений (n = 23)	187,1±111,3 (20,3-511,4)	3321±254,4 (2902,7-3689,3)	1098,4±443,0 (485,9-2473,2)

Примечание. * – различие достоверно относительно аналогичного показателя в подгруппе, $p < 0,05$;
n – число проб биологических жидкостей;
min-max – пределы колебаний показателя.

роста в патологическом глазном неоангиогенезе. Содержание VEGF-A в СЖ 3490 пг/мл и выше может быть использовано в качестве прогностического критерия обильной васкуляризации пролиферативной ткани при непрозрачных оптических средах.

Наиболее тяжелые клинические проявления осложненной ПДР, выраженные интраоперационные геморрагические осложнения ассоциировались с резко повышенным содержанием сывороточного VEGF-A, а также достоверно

высокими интраокулярными уровнями данного ростового фактора, что свидетельствует о локальном и системном характере нарушений. Уровни VEGF-A в СК, превышающие 300 пг/мл, могут использоваться как критерий прогноза осложненного течения операции. Кроме того, тяжелые интраоперационные геморрагические осложнения возможны на фоне резко сниженного интраокулярного уровня VEGF-A, что может объясняться срывом локальной иммунорегуляции у таких пациентов.

Список литературы / References

1. Диагностика и лечение диабетической ретинопатии и диабетического макулярного отека. Федеральные клинические рекомендации (протоколы лечения). М.: ООО «Ассоциация врачей-офтальмологов», 2013. С. 18. [Diagnosis and treatment of diabetic retinopathy and diabetic macular edema. Federal clinical recommendations (treatment protocols)]. Moscow: All-Russian public organization «Association of ophthalmologists», 2013, p. 18.
2. Балашевич Л.И., Бржевский В.В., Измайлов А.С. Глазные проявления диабета. СПб., 2004. С. 382. [Balashevich L.I., Brzhevsky V.V., Izmailov A.S. Ocular manifestations of diabetes]. St. Petersburg, 2004, p. 382.
3. Нероев В.В., Слепова О.С., Зайцева О.В., Курчаева З.В. Особенности локальной и системной продукции эндотелина при осложненной пролиферативной диабетической ретинопатии // Российский офтальмологический журнал, 2015. Т. 8, № 3. С. 31-37. [Neroev V.V., Slepova O.S., Zaytseva O.V., Kurchaeva Z.V. Features of local and systemic production of endothelin in complicated proliferative diabetic retinopathy. *Rossiyskiy oftal'mologicheskii zhurnal* = *Russian Ophthalmological Journal*, 2015, Vol. 8, no. 3, pp. 31-37. (In Russ.)]
4. Шишкин М.М., Юлдашева Н.М. Интравитреальное введение ингибиторов ангиогенеза как этап щадящей витреоретинальной хирургии пролиферативной диабетической ретинопатии // Вестник НМХЦ им. Н.И. Пирогова, 2011. Т. 6, № 1. С. 77-81. [Shishkin M.M., Yuldashev N.M. Intravitreal administration of inhibitors of angiogenesis as a stage of gentle vitreoretinal surgery of proliferative diabetic retinopathy. *Vestnik NMHTS im. N.I. Pirogova* = *Bulletin SMSC named by N.I. Pirogov*, 2011, Vol. 6, no. 1, pp. 77-81. (In Russ.)]
5. Agarwal D., Gelman R., Prospero Ponce C., Stevenson W., Christoforidis J.B. Vitreomacular Interface in Diabetic Retinopathy. *J. Ophthalmol.*, 2015, Vol. 2015, p. 392983.
6. Schlingemann R.O., van Hinsbergh V.W. Role of vascular permeability factor/ vascular endothelial growth factor in eye disease. *Br. Ophthalmol.*, 1997, Vol. 81, no. 6, pp. 501-512.
7. Senger D.R., Galli S.J., Dvorak A.M., Perruzzi C.A., Harvey V.S., Dvorak H.F. Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*, 1983, Vol. 219, no. 4587, pp. 983-985.
8. Bhisitkul R.B. Vascular endothelial growth factor biology: clinical implications for ocular treatments. *Br. J. Ophthalmol.*, 2006, Vol. 90, no. 12, pp. 1542-1547.
9. Levy N.S., Chung S., Furneaux H., Levy A.P. Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.*, 1998, Vol. 273, no. 11, pp. 6417-6423.
10. Adamis A.P., Shima D.T., Yeo K.T., Yeo T.K., Brown L.F., Berse B., D'Amore P.A., Folkman J. Synthesis and secretion of vascular permeability factor / vascular endothelial growth factor by human retinal pigment epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1993, Vol. 193, no. 2, pp. 631-638.
11. Aiello L.P., Northrup J.M., Keyt B.A., Takagi H., Iwamoto M.A. Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor in retinal cells. *Arch. Ophthalmol.*, 1995, Vol. 113, no. 12, pp. 1538-1544.
12. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. N. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 6, pp. 669-676.
13. Gilbert R.E., Vranes D., Berka J.L., Kelly D.J., Cox A., Wu L.L., Stacker S.A., Cooper M.E. Vascular endothelial growth factor and its receptors in control and diabetic rat eyes. *Lab Invest.*, 1998, Vol. 78, no. 8, pp. 1017-1027.
14. Murata T., Nakagawa K., Khalil A., Ishibashi T., Inomata H., Sueishi K. The relation between expression of vascular endothelial growth factor and breakdown of the blood-retinal barrier in diabetic rat retinas. *Lab. Invest.*, 1996, Vol. 74, no. 4, pp. 819-825.
15. Gilbert R.E., Vranes D., Berka J.L., Kelly D.J., Cox A., Wu L.L., Stacker S.A., Cooper M.E. Endothelial cell hypertrophy induced by vascular endothelial growth factor in the retina: new insights into the pathogenesis of capillary nonperfusion. *Arch. Ophthalmol.*, 2001, Vol. 119, no. 6, pp. 861-866.
16. Witmer A.N., Blaauwgeers H.G., Weich H.A., Alitalo K., Vrensen G.F., Schlingemann R.O. Altered expression patterns of VEGF receptors in human diabetic retina and in experimental VEGF-induced retinopathy in monkey. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2002, Vol. 43, no. 3, pp. 849-857.
17. Wong C.G., Rich K.A., Liaw L.H., Hsu H.T., Berns M.W. Intravitreal VEGF and bFGF produce florid retinal neovascularization and hemorrhage in the rabbit. *Curr. Eye Res.*, Vol. 22, no. 2, pp. 140-147.
18. Tolentino M.J., McLeod D.S., Taomoto M., Otsuji T., Adamis A.P., Luttly G.A. Pathologic features of vascular endothelial growth factor-induced retinopathy in the nonhuman primate. *Am. J. Ophthalmol.*, 2002, Vol. 133, no. 3, pp. 373-385.

19. Aiello L.P., Avery R.L., Arrigg P.G., Keyt B.A., Jampel H.D., Shah S.T., Pasquale L.R., Thieme H., Iwamoto M.A., Park J.E., Hung V.N., Aiello L.M., Napoleone F., George L. Vascular endothelial growth factor in ocular fluid patients with diabetic retinopathy and other retinal disorders. *N. Eng. J. Med.*, 1994, Vol. 331, no. 22, pp. 1480-1487.
20. Adamis A.P., Miller J.W., Bernal M.T., D'Amico D.J., Folkman J., Yeo T.K., Yeo K.T. Increased vascular endothelial growth factor levels in the vitreous of eyes with proliferative diabetic retinopathy. *Am. J. Ophthalmol.*, 1994, Vol. 118, no. 4, pp. 445-450.
21. Amin R.H., Frank R.N., Kennedy A., Elliott D., Puklin J.E., Abrams G.W. Vascular endothelial growth factor is present in glial cells of the retina and optic nerve of human subjects with nonproliferative diabetic retinopathy. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, 1997, Vol. 38, no. 1, pp. 36-47.
22. Sack R.A., Conradi L., Krumholz D., Beaton A., Sathe S., Morris C. Membrane array characterization of 80 chemokines, cytokines and growth factor in open and closed eye tears: angiogenin and other defense system constituents. *Invest. Ophthalmol. Vis Sci.*, 2005, Vol. 46, no. 4, pp. 1228-1238.
23. Funatsu H., Yamashita H., Nakamura S., Mimura T., Eguchi S., Noma H., Hori S. Vitreous levels of pigment epithelium-derived factor and vascular endothelial growth factor are related to diabetic macular edema. *Ophthalmology*, 2006, Vol. 113, no. 2, pp. 294-301.
24. Nishikiori N., Osanai M., Chiba H., Kojima T., Mitamura Y., Ohguro H., Sawada N. Glial Cell-Derived Cytokines Attenuate the Breakdown of Vascular Integrity in Diabetic. *Diabetes.*, 2007, Vol. 56, no. 5, pp. 1333-1340.
25. Tripathi R.C., Li J., Tripathi B.J., Chalam K.V., Adamis A.P. Increased level of vascular endothelial growth factor in aqueous humor of patients with neovascular glaucoma. *Ophthalmology*, 1998, Vol. 105, no. 2, pp. 232-237.
26. Noma H., Funatsu H., Yamashita H., Kitano S., Mishima H.K., Hori S. Regulation of angiogenesis in diabetic retinopathy: possible balance between vascular endothelial growth factor and endostatin. *Arch. Ophthalmol.*, 2002, Vol. 120, no. 8, pp. 1075-1080.
27. Shinoda K., Ishida S., Kawashima S., Wakabayashi T., Uchida M., Matsuzaki T., Takayama M., Shinmura K., Yamada M. Clinical factors related to the aqueous levels of vascular endothelial growth factor and hepatocyte growth factor in proliferative diabetic retinopathy. *Curr Eye Res.*, 2000, Vol. 21, no. 2, pp. 655-661.
28. Wang J., Chen S., Jiang F., You C., Mao C., Yu J., Han J., Zhang Z., Yan H. Vitreous and plasma VEGF levels as predictive factors in the progression of proliferative diabetic retinopathy after vitrectomy. *Curr Eye Res.*, 2000, Vol. 21, no. 2, pp. 655-651.
29. Funatsu H., Yamashita H., Noma H., Mimura T., Sakata K., Hori S. Risk evaluation of vitreous surgery for proliferative diabetic retinopathy based on vitreous level of vascular endothelial growth factor and angiotensin II. *Br. J. Ophthalmol.*, 2004, Vol. 88, no. 8, pp. 1064-1068.
30. Funatsu H., Yamashita H., Mimura T., Noma H., Nakamura S., Hori S. Risk evaluation of outcome of vitreous surgery based on vitreous levels of cytokines. *Eye*, 2007, Vol. 21, no. 3, pp. 377-382.

Авторы:

Нероев В.В. — д.м.н., профессор, директор ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Зайцева О.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник отдела по лечению патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

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

Курчаева З.В. — аспирант отдела патологии сетчатки и зрительного нерва ФГБУ «Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Neroev V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, H. Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Zaytseva O.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Department for Treatment of Retinal and Optic Nerve Diseases, H. Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

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

Kurchaeva Z.V., Graduate Student, Department for Treatment of Retinal and Optic Nerve Diseases, H. Helmholtz Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

Поступила 17.02.2016
Отправлена на доработку 23.03.2016
Принята к печати 17.05.2016

Received 17.02.2016
Revision received 23.03.2016
Accepted 17.05.2016

ИНТЕНСИВНОСТЬ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ И ИММУННЫЙ СТАТУС У БОЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗОМ

Саркисян Н.С., Пономаренко Д.Г., Логвиненко О.В., Ракитина Е.Л.,
Костюченко М.В., Куличенко А.Н.

ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Резюме. Исследователями предложен новый методический подход к экспресс-оценке степени интенсивности специфической сенсibilизации при остром бруцеллезе, обладающий высокой чувствительностью – 96,6%, специфичностью – более 95,7%. Выявлено наличие прямой связи интенсивности специфической IgE-зависимой сенсibilизации с формированием у больных бруцеллезом иммуносупрессивного состояния: снижение общего количества CD3⁺ клеток на 17,9%, CD3⁺CD4⁺ – на 13,3%, CD16⁺CD56⁺ – на 4,39%, фагоцитарной активности нейтрофилов крови – в среднем на 25,8%. Показано, что повышение степени реакин-обусловленной алергизации при бруцеллезе тесно ассоциировано с формированием выраженной иммуносупрессии.

Ключевые слова: бруцеллез, *in vitro* аллегодиагностика, тест активации базофилов, иммуносупрессия

INTENSITY OF SPECIFIC SENSITIZATION AND IMMUNE PROFILE IN PATIENTS WITH BRUCELLOSIS

Sarkisyan N.S., Ponomarenko D.G., Logvinenko V.O., Rakitina E.L.,
Kostyuchenko M.V., Kulichenko A.N.

Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation

Abstract. The authors propose a new methodological approach to rapid intensity assessment of specific sensitization in acute brucellosis. This technique shows high sensitivity (98%), and specificity (97%). We revealed a direct relation between the intensity of specific IgE-dependent sensitization accompanied by development of immunosuppressive state in patients with brucellosis, i.e., a mean reduction of total CD3⁺ cell counts by 17.9%; CD3⁺CD4⁺ cells, by 13.3%; CD16⁺CD56⁺, by 4.4%. Phagocytic ability of blood neutrophils was decreased by 25.8%. The study has shown that an increased reagin-dependent sensitization in brucellosis is closely associated with emergence of severe immunosuppression.

Keywords: brucellosis, *in vitro* allergodiagnosics, basophil activation test, immunosuppression

Адрес для переписки:

Саркисян Нушик Сааковна
ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт»
Роспотребнадзора
355035, Россия, г. Ставрополь, ул. Советская, 13-15.
Тел.: 8 (962) 425-01-29.
Тел./факс: 8 (8652) 26-03-12.
E-mail: nyshik@yandex.ru

Address for correspondence:

Sarkisyan Nushik S.
Stavropol Antiplague Institute
355035, Russian Federation, Stavropol,
Sovietskaya str., 13-15.
Phone: 7 (962) 425-01-29.
Phone/fax: 7 (8652) 26-03-12.
E-mail: nyshik@yandex.ru

Образец цитирования:

Н.С. Саркисян, Д.Г. Пономаренко, О.В. Логвиненко,
Е.Л. Ракитина, М.В. Костюченко, А.Н. Куличенко
«Интенсивность специфической сенсibilизации
и иммунный статус у больных бруцеллезом»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4.
С. 365–372.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-365-372

© Саркисян Н.С. и соавт., 2016

For citation:

N.S. Sarkisyan, D.G. Ponomarenko, V.O. Logvinenko,
E.L. Rakitina, M.V. Kostyuchenko, A.N. Kulichenko
“Intensity of specific sensitization and immune profile in patients
with brucellosis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 365–372.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-365-372

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-365-372>

Введение

Бруцеллез остается одной из наиболее опасных инфекций, общих для человека и животных, в регионах с развитым животноводством. Патогенетические и клинические особенности бруцеллезной инфекции взаимообусловлены рядом факторов, определяющим из которых является степень специфической сенсибилизации и иммунологическая реактивность организма [1, 5].

Отечественные и иностранные исследователи указывают, что формирование бактериальной аллергии при бруцеллезе и ее интенсивность могут выступать в качестве основного патогенетического фактора в формировании очаговых специфических органных поражений. Метастазирование инфекта, в том числе и вторичное, чаще происходит на фоне выраженного ослабления иммунитета [10, 15]. Соответственно, интенсивность специфической сенсибилизации и изменения иммунологической резистентности у больных бруцеллезом может иметь причинно-следственную связь, проследить которую можно с использованием методов количественной оценки уровня аллергизации организма.

В развитии аллергических реакций немедленного типа ведущая роль отводится базофилам [7, 14]. Свойства базофильных гранулоцитов и особенности их антигенреактивности дают основания полагать, что эта популяция лейкоцитов может быть оптимальной «мишенью» для клеточного теста *in vitro*.

С учетом того, что при взаимодействии *in vivo* аллергенов с комплементарными молекулами IgE на мембране базофилов инициируется каскад ферментных реакций, приводящих к дегрануляции базофильных гранулоцитов, явление дегрануляции (активации) базофилов может быть основой для разработки нового подхода к оценке специфической сенсибилизации. Имеются данные о перспективах детекции маркеров активации базофилов CD294, CD203c, CD63 (gp53), под действием аллергенов, с использованием моноклональных антител и определением количества активированных антигеном клеток с помощью проточной цитофлуориметрии [9, 13].

Наиболее информативные рецепторы дегрануляции базофилов внутриклеточные антигены CD63, после стимуляции аллергеном происходит дегрануляция клеток и CD63 оказываются на поверхности базофилов. Процесс дегрануляции происходит путем экзоцитоза клетки и выбросом содержимого в межклеточную среду [8, 9, 11].

В 1994 году Sainte-Laudu et al. предложил детектировать дегрануляцию базофилов методом проточной цитометрии. Благодаря используемой технологии CAST® (Cellular Antigen Stimulation Test, тест антигенной стимуляции клеток), спо-

соб обладает высокой специфичностью по сравнению с классическими методиками [12].

Анализ доступной отечественной и зарубежной литературы свидетельствует о высокой эффективности использования в качестве основы для разработки метода оценки специфической реакин-опосредованной сенсибилизации при бруцеллезе теста активации базофилов. Технология позволяет исследовать цельную кровь, использовать растворимые тест-аллергены, предназначенные для кожных проб (бруцеллин), выявлять реакин-опосредованную аллергизацию даже при низких концентрациях сывороточного специфического IgE.

Цель работы — количественно оценить степень IgE-опосредованной специфической сенсибилизации организма и изучить связь интенсивности аллергизации с изменениями в иммунном статусе у больных бруцеллезом.

Материалы и методы

Для решения поставленных в работе задач в течение 2012-2015 гг. был исследован клинический материал от 209 человек с лабораторно подтвержденным диагнозом — острый бруцеллез, поступивших в отделение по диагностике, лечению и экспертизе профпатологии бруцеллеза, ГБУЗ СК «Городская клиническая больница № 2» г. Ставрополя. Также обследовано 19 человек иммунизированных против бруцеллеза вакциной на основе штамма *Brucella abortus* 19 BA (на 30-35 сутки после вакцинации). С целью определения специфичности предлагаемого теста исследовали кровь 93 человек, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции: 13 беременных (31-33 неделя беременности), 40 обследуемых в возрасте от 2-х до 67 лет с аллергией в анамнезе, 40 человек, не имевших в анамнезе симптомов аллергии.

Отбор и рандомизацию больных бруцеллезом по группам производили в соответствии с индивидуальными регистрационными картами больных (истории болезни), с учетом классификации клинических форм бруцеллеза по Г.П. Рудневу (1955). Все больные острым бруцеллезом имели среднюю степень тяжести течения болезни, в фазе компенсации.

Различия показателей в зависимости от пола в группах не имели статистической значимости, в связи с чем мы сочли возможным объединить обследованных без учета их половой принадлежности.

Все обследуемые дали информированное согласие на проведение настоящих исследований.

Комплексное иммунологическое обследование включало:

— определение субпопуляционного состава лимфоцитов ($CD3^+$, $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, $CD16^+56^+$, $CD19^+$) на проточном цитометре FACS Calibur (США), с использованием моноклональных антител (МКАТ) Beckman Coulter (США);

— оценку фагоцитарной и функциональной активности нейтрофилов крови, которую осуществляли в соответствии с общепринятыми методами;

— выявление уровня общих иммуноглобулинов А, М, G в сыворотке крови методом радиальной иммунной диффузии с моноспецифическими сыворотками производства ФГУП НПО «Микроген» (Россия);

— определение комплементарной активности сыворотки крови по 50% гемолизу эритроцитов барана;

— выявление концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) осуществляли с помощью фотоколориметрии в реакции с ПЭГ — 6000 [3].

Наличие и интенсивность IgE-зависимой аллергической реакции к возбудителю бруцеллеза определяли, используя новый методический подход [6], который заключался в антигенспецифической активации базофилов в условиях *in vitro*.

В качестве аллергена использовали «Аллерген бруцеллезный жидкий (бруцеллин)», Рег. №: ЛС-002624 (ФГУП «НПО Микроген», Россия). Одна внутрикожная доза (0,1 мл) содержит от 3,8 до 5,4 мкг белка.

Определение клинической информативности предложенного теста *in vitro* оценки степени специфической сенсibilизации, проводили по ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические». Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов».

Обеззараживание исследуемого материала от больных бруцеллезом людей осуществляли в соответствии с СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I-II групп патогенности (опасности)».

Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием стандартного пакета компьютерных программ Microsoft Excel. Достоверность различия средних рассчитывали по критерию Стьюдента (t) для коэффициентов вариации, уровень значимости Р выбран менее 0,05. С целью выявления коррелятивной связи применяли метод ранговой корреляции Спирмена, считая значения коэффициента, равные 0,3 и менее, показателями слабой тесноты связи; значения более 0,4, но менее 0,7 — показателями умеренной тесноты

связи, а значения 0,7 и более — показателями высокой тесноты связи [4].

Результаты

Для разработки метода количественной оценки интенсивности IgE-опосредованной сенсibilизации, основанного на тесте активации базофилов, опытным путем определено количество антигена, необходимое для специфической стимуляции клеток. Испытывали следующие дозировки аллергена: 10, 25, 50, 100 и 200 мкл. При *in vitro* стимуляции бруцеллином базофилов крови обследуемых контрольной группы, беременных, лиц с аллергиями, вне зависимости от количества аллергена, полученные результаты не превышали 5%, поэтому мы сочли возможным объединить их в группу контроля.

При *in vitro* стимуляции бруцеллином базофилов крови больных бруцеллезом и привитых против бруцеллеза имелась определенная зависимость от количества внесенного аллергена в анализируемую пробу.

Объем 10 и 25 мкл бруцеллина является недостаточным для специфической активации. При внесении в анализируемые пробы 50 мкл, 100 мкл и 200 мкл бруцеллина наблюдали увеличение количества активированных базофилов, однако, стабильно воспроизводимый результат у 100% обследуемых (больных бруцеллезом и вакцинированных против бруцеллеза) получен при активации базофилов 50 мкл аллергена, соответственно, данный объем бруцеллина является оптимальным для выявления в условиях *in vitro* реактин-зависимой специфической сенсibilизации при бруцеллезе. Для подтверждения специфичности метода проведена оценка интенсивности активации базофилов крови больных бруцеллезом различными бактериальными аллергенами, используемыми для алергодиагностики инфекционных болезней: антраксином, тулярином, туберкулином, и для выявления возможной спонтанной активации базофилов — стерильным физиологическим раствором.

Учитывая, что у группы не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции (n = 93) количество активированных бруцеллином базофилов находилось в диапазоне от 0 до 5 %, соответственно, цифровое значение, принятое на основании экспериментальных данных в качестве критерия наличия специфической сенсibilизации при бруцеллезе (порог клинического решения) — активация более 5% базофилов под действием бруцеллина в условиях *in vitro*.

Клиническую информативность лабораторного метода *in vitro* оценки степени специфической сенсibilизации определяли по показателям диа-

гностической чувствительности и специфичности.

Диагностическую чувствительность оценивали путем определения количества положительных результатов аллерготестирования *in vitro* с бруцеллином среди лиц с клинически и лабораторно подтвержденным диагнозом «Острый бруцеллез». Из 209 больных острым бруцеллезом со средней степенью тяжести течения, в фазе компенсации у 202 обследованных получен положительный результат теста — активировались бруцеллином 5,1% и более базофилов, соответственно, чувствительность метода при диагностике острого бруцеллеза — 96,6%.

Диагностическую специфичность определяли при подсчете положительных результатов аллерготестирования *in vitro* с бруцеллином у лиц не больных, не переболевших бруцеллезом и не вакцинированных против этой инфекции. Из 93 обследованных (в т. ч. беременные — 13 и обследованные с аллергией — 40), положительный результат аллерготестирования с бруцеллином *in vitro* получен у 4 лиц, имевших в анамнезе аллергию, соответственно, специфичность теста — 95,7%.

Учитывая вышеизложенное, предложенный методический подход к *in vitro* количественной оценке интенсивности реакин-опосредованной (IgE-зависимой) специфической сенсибилизации организма при остром бруцеллезе, основанный на тесте активации базофилов с ци-

тометрическим учетом результатов, обладает следующими характеристиками: высокой чувствительностью — 96,6%, специфичностью — более 95,7%, экспрессностью — время, затраченное на постановку и учет реакции, не превышает 2-х часов. Метод технически не сложен и легко воспроизводим.

В ходе дальнейшего исследования больные острым бруцеллезом ($n = 127$) по степени специфической реакин-опосредованной (IgE-зависимой) сенсибилизации были рандомизированы на 3 группы. Обследуемые с низкой степенью специфической сенсибилизации от 5,1 до 10 % составили группу № 1 ($n = 32$), группу № 2 сформировали больные бруцеллезом со средней (умеренной) степенью специфической сенсибилизации от 11 до 25% ($n = 56$) и 39 больных бруцеллезом с высокой степенью специфической сенсибилизации более 25% — составили группу № 3.

При анализе результатов исследования связи IgE-опосредованной специфической сенсибилизации с компенсаторными и патологическими изменениями в иммунном статусе больных бруцеллезом у обследуемых второй группы выявлено статистически достоверное повышение следующих показателей. Данные представлены в таблице 1.

У обследованных больных со средней (умеренной) степенью реакиновой гиперчувствительности были выявлены компенсаторные изме-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗОМ С НИЗКОЙ (группа № 1) И СРЕДНЕЙ (группа № 2) СТЕПЕНЬЮ РЕАГИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ($M \pm m$)

Показатели, ед. измерения	Группа № 1 ($n = 32$)	Группа № 2 ($n = 56$)	P, уровень достоверности межгрупповых различий
Т-лимфоциты (CD3 ⁺), %	68,87±1,25	82,9±1,16	$p \leq 0,001$
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	39,1±2,38	55,6±0,94	$p \leq 0,001$
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	24,18±2,24	43,6±0,88	$p \leq 0,001$
НК-клетки (CD16 ⁺ CD56 ⁺), %	10,19±1,15	6,65±0,37	$p \leq 0,01$
В-лимфоциты (CD19 ⁺), %	12,17±1,32	8,54±0,27	$p \geq 0,1$
ИРИ, у.е.	1,61±0,06	1,27±0,05	$p \leq 0,001$
Фагоцитарная активность нейтрофилов крови, %	76,3±3,76	50,0±1,26	$p \leq 0,001$
Функциональная активность (НСТ-тест), %	6,98±1,3	18,42±0,97	$p \leq 0,001$
IgA, мг/мл	2,02±0,24	4,18±0,41	$p \leq 0,001$
IgM, мг/мл	1,37±0,09	1,42±0,06	$p \leq 0,001$
IgG, мг/мл	10,30±0,92	15,5±0,81	$p \leq 0,001$
ЦИК, Ед	12,3±1,02	64,0±0,92	$p \leq 0,001$
Комплементарная активность сыворотки крови, Ед	30,23±2,25	68,75±1,9	$p \leq 0,001$

нения иммунологических показателей: повышение количества Т-лимфоцитов, субпопуляции $CD3^+CD4^+$, $CD3^+CD8^+$, дисбаланс субпопуляций Т-клеток, повышение функциональной активности нейтрофилов, увеличение уровня сывороточных IgA и IgG, ЦИК и комплементарной активности сыворотки крови. На фоне приспособительных процессов иммунной системы были выявлены и дезадаптивные изменения, которые выражались в снижении количества естественных киллеров, В-лимфоцитов, значительном ослаблении фагоцитарной активности нейтрофилов.

При проведении корреляционного анализа степени взаимосвязи интенсивности IgE-зависимой специфической сенсибилизации с компенсаторными и патологическими изменениями в иммунном статусе больных группы № 2 показано, что степень специфической сенсибилизации в значительной степени обуславливает изменения в иммунном статусе. Использование корреляционного анализа позволило выявить силу данной зависимости.

Корреляционный анализ показателей больных 2 группы выявил прямую зависимость интенсивности IgE-опосредованной сенсибилизации с повышением функциональной активности нейтрофилов крови ($r = 0,938$; $p \leq 0,01$), снижением относительного количества лимфоцитов, экспрессирующих рецепторы $CD16^+CD56^+$ ($r = 0,595$; $p \leq 0,01$) и иммунорегуляторного индекса ($r = 0,430$;

$p \leq 0,01$), увеличением содержания сывороточного иммуноглобулина А ($r = 0,543$; $p \leq 0,01$), повышением уровня ЦИК ($r = 0,027$) и относительного количества $CD19^+$ лимфоцитов ($r = 0,386$; $p \leq 0,01$) и IgM ($r = 0,220$; $p \leq 0,01$) соответственно.

Установлена статистически достоверная ($p \leq 0,01$) обратно пропорциональная зависимость степени реакиновой гиперчувствительности с комплементарной активностью сыворотки крови ($r = -0,690$), с относительным содержанием $CD3^+$ Т-лимфоцитами ($r = -0,571$), $CD3^+CD4^+$ -Т-хелперов ($r = -0,600$), $CD3^+CD8^+$ -Т-цитотоксических ($r = -0,300$) и с уровнем IgG ($r = -0,600$).

Анализируя результаты иммунологического обследования больных с высокой степенью IgE-зависимой специфической сенсибилизации, установили следующие особенности изменения иммунологических показателей. Данные представлены в таблице 2.

У больных бруцеллезом с высокой степенью специфической сенсибилизации по реакиновому типу на фоне компенсаторных процессов (повышение переваривающей способности фагоцитов крови, содержания уровня IgA и IgG, ЦИК и комплементарной активности сыворотки крови) выражены явные дисфункциональные изменения, имеющие иммуносупрессивный характер: снижение Т-клеток $CD3^+$, Т-хелперов – $CD3^+CD4^+$, натуральных киллеров, фагоцитарной активности нейтрофилов.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗОМ С НИЗКОЙ (группа № 1) И ВЫСОКОЙ (группа № 3) СТЕПЕНЬЮ РЕАГИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ($M \pm m$)

Показатели, ед. измерения	Группа № 1 (n = 32)	Группа № 3 (n = 39)	P, уровень достоверности межгрупповых различий
Т-лимфоциты ($CD3^+$), %	68,87±1,25	51,0±1,15	$p \leq 0,001$
Т-хелперы ($CD3^+CD4^+$), %	39,1±2,38	25,8±1,7	$p \leq 0,001$
Т-цитотоксические ($CD3^+CD8^+$), %	24,18±2,24	39,6±0,24	$p \leq 0,001$
НК-клетки ($CD16^+CD56^+$), %	10,19±1,15	5,8±0,37	$p \leq 0,01$
В-лимфоциты ($CD19^+$), %	12,17±1,32	12,5±1,2	$p \geq 0,1$
ИРИ, у.е.	1,61±0,06	0,65±0,86	$p \geq 0,1$
Фагоцитарная активность нейтрофилов крови, %	76,3±3,76	50,5±2,3	$p \leq 0,001$
Функциональная активность (НСТ-тест), %	6,98±1,3	19,1±1,3	$p \leq 0,001$
IgA, мг/мл	2,02±0,24	4,03±0,17	$p \leq 0,001$
IgM, мг/мл	1,37±0,09	1,51±0,15	$p \leq 0,05$
IgG, мг/мл	10,30±0,92	15,5±0,73	$p \leq 0,001$
ЦИК, Ед	12,3±1,02	69,8±3,4	$p \leq 0,001$
Комплементарная активность сыворотки крови, Ед	30,23±2,25	69,7±2,1	$p \leq 0,001$

При проведении корреляционного анализа степени взаимосвязи интенсивности IgE-зависимой специфической сенсибилизации с компенсаторными и патологическими изменениями в иммунном статусе больных группы № 3 установлено, что степень специфической сенсибилизации в значительной степени связана с изменениями в иммунном статусе. Использование корреляционного анализа позволило выявить силу и достоверности анной зависимости. Анализ данных корреляции выявил прямую пропорциональную взаимосвязь высокой степени специфической сенсибилизации со снижением относительного количества CD3⁺ клеток ($r = 0,914$), CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов ($r = 0,957$), CD3⁺CD8⁺ клеток ($r = 0,725$), повышением уровня IgA ($r = 1,01$; $p \leq 0,01$), увеличением уровня циркулирующих иммунных комплексов ($r = 0,725$; $p \leq 0,01$), в меньшей степени со снижением иммунорегуляторного индекса ($r = 0,215$; $p \geq 0,1$), комплементарной активности сыворотки крови ($r = 0,246$; $p \leq 0,01$), количества CD19⁺ клеток ($r = 0,162$; $p \geq 0,1$) и уровня иммуноглобулина G ($r = 0,264$; $p \leq 0,01$) и IgM ($r = 0,164$; $p \leq 0,01$). Анализ данных выявил прямую зависимость высокой степени специфической сенсибилизации со снижением фагоцитарной активности нейтрофилов крови ($r = 0,291$), относительным содержанием субпопуляций CD16⁺CD56⁺ лимфоцитов ($r = 0,213$; $p \leq 0,01$), а также обратно-пропорциональную зависимость ($r = - 0,482$) с повышением функциональной активности нейтрофилов крови ($p \leq 0,01$).

Сравнительный анализ результатов иммунологического обследования больных со средней (умеренной) и высокой степенью реакин-обусловленной специфической сенсибилизации представлен в таблице 3.

При сравнении показателей иммунного статуса больных бруцеллезом со средней и высокой степенью реакин-опосредованной специфической сенсибилизацией наблюдаются дисфункциональные изменения, имеющие иммуносупрессивный характер: снижение Т-клеток CD3⁺, Т-хелперов – CD3⁺CD4⁺, натуральных киллеров, фагоцитарной активности нейтрофилов.

Корреляционный анализ данных сравнения средней и высокой степени специфической сенсибилизации с иммунологическими показателями показал наличие достоверности ($p \leq 0,01$) прямой пропорциональной взаимосвязи показателя со снижением количества CD3⁺ клеток ($r = 0,895$), CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов ($r = 0,500$), популяции натуральных киллеров CD16⁺CD56⁺ ($r = 0,425$) и CD3⁺CD8⁺ клеток ($r = 0,628$). В ходе исследования выявлена обратно-пропорциональная связь относительно увеличения циркулирующих иммунных комплексов ($r = - 0,757$) и уровня иммуноглобулина G ($r = - 0,475$) в обследуемых группах ($p \geq 0,1$). У больных бруцеллезом выявлена прямая взаимосвязь интенсивности IgE-обусловленной сенсибилизации с комплементарной активностью сыворотки крови ($r = 0,244$; $p \geq 0,1$), повышением CD19⁺ клеток ($r = 0,262$) и уровнем иммуноглобулина A ($p \leq 0,01$). Анализ данных в группах сравнения

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА БОЛЬНЫХ БРУЦЕЛЛЕЗОМ СО СРЕДНЕЙ (группа № 2) И ВЫСОКОЙ (группа № 3) СТЕПЕНЬЮ РЕАГИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ СЕНСИБИЛИЗАЦИИ ($M \pm m$)

Показатели, ед. измерения	Группа № 2 (n = 56)	Группа № 3 (n = 39)	P, уровень достоверности межгрупповых различий
Т-лимфоциты (CD3 ⁺), %	82,9±1,16	51,0±1,15	$p \leq 0,001$
Т-хелперы (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	55,6±0,94	25,8±1,7	$p \leq 0,01$
Т-цитотоксические (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	43,6±0,88	39,6±0,24	$p \leq 0,05$
НК-клетки (CD16 ⁺ CD56 ⁺), %	6,65±0,37	5,8±0,37	$p \geq 0,05$
В-лимфоциты (CD19 ⁺), %	8,54±0,27	12,5±1,2	$p \geq 0,05$
ИРИ, у.е.	1,27±0,05	0,65±0,86	$p \geq 0,1$
Фагоцитарная активность нейтрофилов крови, %	50,0±1,26	50,5 ± 2,3	$p \geq 0,1$
Функциональная активность (НСТ-тест), %	18,42±0,97	19,1±1,3	$p \geq 0,1$
IgA, мг/мл	18,42±0,97	19,1±1,3	$p \geq 0,1$
IgM, мг/мл	1,42±0,06	1,51±0,15	$p \leq 0,05$
IgG, мг/мл	15,5±0,81	15,5±0,73	$p \geq 0,1$
ЦИК, Ед	64,0±0,92	69,8±3,4	$p \geq 0,1$
Комплементарная активность сыворотки крови, Ед	68,75±1,9	69,7±2,1	$p \geq 0,1$

выявил прямую зависимость снижения фагоцитарной ($r = 0,384$) и функциональной активности нейтрофилов крови ($r = 0,440$; $p \leq 0,01$), со степенью интенсивности инфекционной аллергии при бруцеллезе.

Вышеизложенное указывает на то, что интенсивность реакин-опосредованной специфической сенсибилизации у больных бруцеллезом имеет прямую связь с формированием иммуносупрессивного состояния.

Учитывая, что применение проточно-цитометрического анализа позволяет количественно учесть уровень гиперчувствительности организма к возбудителю бруцеллеза, метод антигенной активации лейкоцитов *in vitro* можно использовать для изучения интенсивности алергизации.

Можно предположить, что одним из неблагоприятных прогностических факторов при остром бруцеллезе, с точки зрения генерализации инфекции с переходом в хронический процесс, является высокая степень реакин-зависимой специфической сенсибилизации. Соответственно, больным бруцеллезом с выраженной IgE-обусловленной алергизацией необходима более

длительная антибактериальная терапия с включением в схему лечения десенсибилизирующих средств, стимуляторов клеточного иммунитета и естественной резистентности, в частности фагоцитарной активности.

Выводы

— предложена методика количественной оценки степени интенсивности специфической сенсибилизации при бруцеллезе;

— установлена прямая связь повышения интенсивности специфической IgE-зависимой сенсибилизации (более чем на 10%) с формированием у больных бруцеллезом иммуносупрессивного состояния;

— у больных бруцеллезом с высокой степенью интенсивности специфической IgE-зависимой сенсибилизации (более 25% активированных базофилов) наблюдаются супрессивные изменения в иммунном статусе: снижение общего количества $CD3^+$ клеток в среднем на 17,9%, $CD3^+CD4^+$ — на 13,3%, $CD16^+CD56^+$ — на 4,39%, фагоцитарной активности нейтрофилов крови в среднем — на 25,8%.

Список литературы / References

1. Вершилова П.А., Чернышова М.И., Князева Э.Н. Патогенез и иммунология бруцеллеза. М.: Медицина, 1974. 272 с. [Vershilova P.A., Chernyshova M.I., Knyazeva E.N. Pathogenesis and immunology of brucellosis]. Moscow: Medicine, 1974. 272 p.
2. ГОСТ Р 53022.3-2008 «Технологии лабораторные клинические». Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов». [GOST R 53022.3-2008 "clinical laboratory Technology". Requirements for the quality of clinical laboratory studies. Part 3. The rules of evaluation of clinical informative value of laboratory tests]. (In Russ.)]
3. Кишкун А.А. Иммунологические исследования и методы диагностики инфекционных заболеваний в клинической практике. М.: Медицинское информационное агентство, 2009. 712 с. [Kishkun A.A. the Immunological research and methods of diagnostics of infectious diseases in clinical practice]. Moscow: Medical information Agency, 2009. 712 p.
4. Кобзарь А.И. Прикладная математическая статистика. М.: Физматлит, 2006. С. 626-628. [Kobzar A.I. Applied mathematical statistics]. Moscow: Fizmatlit, 2006, pp. 626-628.
5. Лямкин Г.И., Пономаренко Д.Г., Худолеев А.А., Вилинская С.В., Зайцев А.А., Куличенко А.Н. Эпидемиологическая ситуация по бруцеллезу в Российской Федерации и государствах - участниках Содружества Независимых Государств // Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение, 2016. № 1. С. 68-74. [Lyamkin G.I., Ponomarenko, D.G., Khudoleev A.A. Vilinskaya S.V., Zaitsev A.A., Kulichenko A.N. Epidemiological situation on brucellosis in the Russian Federation and the States – participants of the Commonwealth of Independent States. *Infektsionnye bolezni: novosti, mneniya, obuchenie* = *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*, 2016, no. 1, pp. 68-74. (In Russ.)]
6. Патент № 2574207 Российской Федерации, МПК G01N33/48. Способ дифференциации поствакцинного и инфекционного бруцеллезного процессов по степени повышенной чувствительности организма к бруцеллам в условиях *in vitro* / Пономаренко Д.Г., Ракитина Е.Л., Логвиненко О.В., Саркисян Н.С., Костюченко М.В., Куличенко А.Н., Лямкин Г.И., Голубь О.Г., Бердникова Т.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное казенное учреждение здравоохранения Ставропольский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, опубл. 10.02.2016. [Patent no. 2574207 of the Russian Federation, IPC G01N33/48. Method postvaccinale differentiation and infectious processes in brucellosis degree of hypersensitivity to Brucella in vitro/ Ponomarenko, D.G., Rakitin, E.L., Logvinenko O.V., Sarkisyan N.S., Kostyuchenko M.V., Kulichenko A.N., Lyamkin G.I., Dove, G.O., Berdnikova T.V.; applicant and patentee Federal state institution of health Stavropol research antiplague Institute of Federal service for supervision of consumer rights protection and human welfare, publ. 10.02.2016. (In Russ.)]

7. Ройт А., Бростовф Дж., Мейл Д. Иммунология: [пер. с англ.]. М.: Мир, 2000. 592 с. [Roit A., Brostoff J., Mail D. Immunology: [Engl. Transl.]. Moscow: Mir, 2000. 592 p.]
8. Уханова О. П. Изучение влияния моноклональных антител к IgE на активацию базофилов периферической крови больных сезонным аллергическим ринитом // Аллергология и иммунология, 2010. Т. 11, № 1. С. 54-56. [Ukhanova, O.P. Study of the effect of monoclonal antibodies to IgE on the activation of basophils in the peripheral blood of patients with seasonal allergic rhinitis. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2010, Vol. 11, no. 1, pp. 54-56. (In Russ.)]
9. De Weck A.L., Sanz M.L., Gamboa P.M., Jermann J.M., Kowalski M., Medrala W., Sainte-Laudy J., Schneider M.S., Weber J.M., Wolanczyk-Medrala A. Nonsteroidal anti-inflammatory drug hypersensitivity syndrome: a multicenter study. II. Basophil activation by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its impact on pathogenesis. *J. Invest. Allergol. Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 20, no. 1, pp. 39-57.
10. Galinska E.M., Zagorski J. Brucellosis in humans – etiology, diagnostics, clinical forms. *Ann Agric. Environ. Med.*, 2013, Vol. 20, no. 2, pp. 233-238.
11. Pignatti P., Patrizia P., Giselda C., Mona-Rita Y., Gianni P., Gianna M. Basophil activation test is food adverse reactions. *J. Clin. Transl. Allergy*, 2011, no. 2, Suppl. 1, p. 92.
12. Sainte-Laudy J., Vallon C., Guerin J.C. Analysis of membrane expression of the CD63 human basophil activation marker. Applications to allergologic diagnosis. *Allerg. Immunol.*, 1994, Vol. 26, no. 6, pp. 211-214.
13. Sato S., Tackimoto M., Shukuya A., Kurosaka N., Yanagida N., Utsunomiya T., Iguchi M., Komata T., Imai T., Tomikawa M., Ebisaw M. Basophil activation marker CD203C is useful in the diagnosis of hen's egg and cow's milk allergies in children. *J. Allergy Immunol.*, 2010, Vol. 152, no. 1, pp. 54-61.
14. Schroeder J. T. Basophils: emerging roles in the pathogenesis of allergic disease. *J. Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 242, no. 1, pp. 144-160.
15. Skendros P., Boura P. Immunity to brucellosis. *J. Rev. Sci. Tech.*, 2013, Vol. 32, no. 1, pp. 137-147.

Авторы:

Саркисян Н.С. — врач клинической лабораторной диагностики научно-профилактической клинико-диагностической лаборатории ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Пономаренко Д.Г. — к.б.н., заведующий лабораторией бруцеллеза и сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Логвиненко О.В. — к.б.н., старший научный сотрудник, зав. сектором иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Ракитина Е.Л. — к.м.н., ведущий научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Костюченко М.В. — научный сотрудник сектора иммунологии и патоморфологии особо опасных инфекций лаборатории бруцеллеза ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Куличенко А.Н. — д.м.н., профессор, директор ФКУЗ «Ставропольский противочумный институт» Роспотребнадзора, г. Ставрополь, Россия

Authors:

Sarkisyan N.S., Laboratory Physician, Clinical Research & Prevention Diagnostic Laboratory, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation

Ponomarenko D.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Brucellosis and Division of Immunology and Pathomorphology for Special Danger Infections, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation

Logvinenko V.O., PhD (Biology), Senior Research Associate, Head, Division of Immunology and Pathomorphology for Special Danger Infections, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation

Rakitina E.L., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Division of Immunology and Pathomorphology for Special Danger Infections, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kostyuchenko M.V., Research Associate, Division of Immunology and Pathomorphology for Special Danger Infections, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation

Kulichenko A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Stavropol Antiplague Institute, Stavropol, Russian Federation

Поступила 11.05.2016

Отправлена на доработку 31.05.2016

Принята к печати 14.06.2016

Received 11.05.2016

Revision received 31.05.2016

Accepted 14.06.2016

ЭКСПРЕССИЯ ФАКТОРА ТРАНСКРИПЦИИ FoxP3 ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ

Еремеева А.В., Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Лим В.В., Нёма М.А., Трофимов В.И.

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

Резюме. Были обследованы 47 практически здоровых лиц и 82 больных бронхиальной астмой (БА): 42 с аллергической БА и 40 с неаллергической БА. Экспрессию мРНК FoxP3 оценивали путем проведения ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR).

Полученные данные показывают, что у больных бронхиальной астмой (независимо от клинко-патогенетического варианта) отмечается снижение уровня экспрессии мРНК FoxP3 по сравнению с контрольной группой. При этом больные АБА и НАБА тяжелой степени имеют показатели экспрессии мРНК FoxP3, наименьшие по сравнению со средней и легкой степенями тяжести заболевания.

Выявленное снижение экспрессии мРНК FoxP3 в мононуклеарах периферической крови и повышение уровня IL-17 в сыворотке крови больных бронхиальной астмой может рассматриваться как проявление выраженного воспалительного процесса на фоне, вероятно, существующего дефекта регуляции экспрессии транскрипционного фактора FoxP3, что заставляет предполагать его ключевую роль в регуляции активности воспалительного процесса при бронхиальной астме.

Ключевые слова: бронхиальная астма, транскрипционные факторы, FoxP3, мононуклеары

EXPRESSION OF FoxP3 TRANSCRIPTION FACTOR IN BRONCHIAL ASTHMA

Eremeeva A.V., Sorokina L.N., Mineev V.N., Lim V.V., Nyoma M.A., Trofimov V.I.

First I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Forty-two patients with allergic bronchial asthma (ABA) forty persons with non-allergic bronchial asthma (NABA), and 47 healthy controls were involved into the study. Expression of FoxP3 mRNA was analyzed by RT-PCR. In patients with bronchial asthma (ABA and NABA) we have revealed a significant decrease in FoxP3 mRNA expression levels, in comparison with control group. The patients with severe BA exhibited lowest levels of the FoxP3 mRNA expression as compared with other groups.

We revealed a decreased FoxP3 mRNA expression in mononuclear cells from peripheral blood, and an increased IL-17 level in blood serum of patients with bronchial asthma. These results may be considered a manifestation of serious inflammatory process. Probably, the data may reflect a dysregulated expression of FoxP3 transcription factor. Therefore, we may assume a key role of FoxP3 for regulation of inflammatory activity in bronchial asthma.

Keywords: bronchial asthma, transcription factors, FoxP3, mononuclears

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.
First I. Pavlov State Medical University
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:

А.В. Еремеева, Л.Н. Сорокина, В.Н. Минеев, В.В. Лим,
М.А. Нёма, В.И. Трофимов «Экспрессия фактора
транскрипции FoxP3 при бронхиальной астме»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 373–378.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-373-378

© Еремеева А.В. и соавт., 2016

For citation:

A.V. Eremeeva, L.N. Sorokina, V.N. Mineev, V.V. Lim,
M.A. Nyoma, V.I. Trofimov "Expression of FoxP3 transcription
factor in bronchial asthma", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 373–378.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-373-378

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-373-378>

Введение

FoxP3 — единственный представитель семейства транскрипционных факторов Fox из четырех известных, принимающий участие в жизнедеятельности Т-лимфоцитов. На сегодняшний день не подвергается сомнению важная роль FoxP3 в патогенезе раковых [6] и аутоиммунных [3] заболеваний в качестве основного транскрипционного фактора Treg (регуляторная Т-клетка), а значит, и ключевого фактора сохранения иммунологического гомеостаза посредством реализации супрессивных функций [11].

В отличие от Th2 (Т-хелперов 2) и Th1 (Т-хелперов 1), роль которых хорошо изучена при бронхиальной астме, Treg являются относительно «новым» объектом интереса ученых при данной патологии. Тем не менее Treg и их ключевой транскрипционный фактор FoxP3 ранее неоднократно демонстрировали свою роль в качестве ключевых компонентов поддержания иммунологического гомеостаза при других заболеваниях.

В контексте изучения данного транскрипционного фактора при бронхиальной астме особый интерес представляет его взаимодействие с Th2 и Th17. FoxP3 продемонстрировал способность подавлять экспрессию IL-2, TNF α , IFN γ , IgE, IL-17 и IL-4, причем подавление IL-17, вероятнее всего, обусловлено изменением транскрипционной активности ROR γ и ROR α , ключевых транскрипционных факторов Th17 [10, 11, 12]. В целом, согласно сложившемуся на сегодняшний день представлению, участие FoxP3 в патогенезе бронхиальной астмы аналогично его участию при других патологиях: активация регуляторных Т-клеток служит признаком подавления воспалительного процесса [7, 8] и предлагается для использования в качестве мониторинга ответа на терапию аллергических заболеваний [9].

В данной статье предпринята попытка исследования экспрессии FoxP3 в мононуклеарах периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой и практически здоровых лиц контрольной группы.

Материалы и методы

Нами обследовано 47 практически здоровых лиц и 82 больных БА: 42 с аллергической БА и 40 с неаллергической БА. Все обследованные больные БА находились на лечении в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Черноруцкого Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

Всем больным проводили комплексное клинико-лабораторное обследование, а также аллергологическое и гормональное исследования. В каждой обследованной группе проводили исследование функции внешнего дыхания.

Диагноз БА устанавливали в соответствии с классификацией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (Global Initiative of Asthma — GINA, 2015).

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови

В качестве модели исследования во всех охарактеризованных ниже методиках выбраны мононуклеарные клетки периферической крови. Не позднее чем через 40 мин после получения венозной крови проводили выделение клеток методом центрифугирования в градиенте плотности “Lymphoseparation Medium” (производство “MP Biomedicals”, США), плотность 1,077 г/см³ (Boyum A., 1968). Гепаринизированную кровь разводили в два раза раствором хлорида натрия (9 г/л, pH = 7,2), наслаивали на 3 мл градиента плотности и центрифугировали 30 мин при 400 g. Образовавшееся в интерфазе «кольцо» мононуклеаров отбирали пипеткой, полученную клеточную взвесь трижды отмывали раствором хлорида натрия (9 г/л, pH = 7,2) и доводили концентрацию до 2×10^6 клеток/мл. Жизнеспособность клеток, которую определяли по связыванию трипанового синего, составляла 95–100%.

Исследование экспрессии мРНК FoxP3 методом RT-PCR

Работа выполнена на базе лаборатории Научно-методического центра по молекулярной медицине на базе ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Экспрессию мРНК FoxP3 оценивали путем проведения RT-PCR (reverse transcription — PCR) с нуклеиновыми кислотами, выделенными из мононуклеаров периферической крови. ПЦР проводилась в амплификаторе «iCycler» (BIO-RAD) в следующем режиме: инициация при 95 °C в течение 4-х минут, 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. Завершающая полимеризация проводилась при 72 °C в течение 7 минут. Продукт амплификации размером 339 пар оснований подвергали электрофорезу в 1,5% агарозном геле и окраске этидия бромидом. Праймеры для FoxP3 и β -актина были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank):

Прямой праймер: 5-TGGAGAGCCAGCCATGAT-3

Обратный праймер: 5-GCCACGTTGATCCAGGTG-3

Результаты электрофореза после фотографирования в ультрафиолетовом свете анализировали в программе Gel-Pro 3.1. Уровень экспрессии мРНК FoxP3 оценивали относительно уровня β -актина.

Определение концентрации IL-17 сыворотки проводилось методом ИФА с применением стандартной методики при использовании коммерческих наборов (ООО «Цитокин», Россия) на ИФА-анализаторе StatFlax 303+ с длиной волны 450 нм с построением калибровочной кривой «от точки к точке».

Методы статистической обработки

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью стандартного пакета прикладного статистического анализа SPSS для Windows (русифицированная версия 21.0). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Нами проведена сравнительная оценка уровней экспрессии FoxP3 у практически здоровых лиц и пациентов с аллергической/неаллергической бронхиальной астмой (результаты представлены в таблице 1).

Как видно из представленных результатов, уровень экспрессии мРНК транскрипционного фактора FoxP3 в мононуклеарах периферической крови лиц контрольной группы более чем в два раза превышал таковой у лиц группы АБА и НАБА (статистическая значимость различий выявлена для группы контроля и больных НАБА, $p = 0,025$, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни). У больных бронхиальной астмой больший уровень экспрессии зафиксирован у лиц с аллергической БА.

Анализ зависимости экспрессии FoxP3 в зависимости от фазы заболевания не показал статистических различий между фазами ремиссии и обострения заболевания как при НАБА, так и при АБА (данные не представлены). Повидимому, экспрессия FoxP3 не имеет четкой зависимости от фазы заболевания.

Нами был проведен анализ с целью выявления возможных различий в экспрессии FoxP3 при разных степенях тяжести бронхиальной астмы. Анализ проводился отдельно для групп АБА и НАБА. Результаты представлены ниже в таблицах 2 и 3.

Как видно из представленных результатов, как группа АБА, так и группа НАБА характеризовались присутствием статистически достоверных различий в уровнях экспрессии FoxP3 в группах при разной тяжести заболевания.

В группе аллергической бронхиальной астмы наибольшим уровнем экспрессии FoxP3 характеризовались пациенты со средней тяжестью заболевания. Несколько меньшей экспрессией транскрипционного фактора характеризовалась подгруппа легкой БА, при этом у пациентов с тяжелой АБА величины экспрессии FoxP3 были в 6–8 раз ниже, чем в подгруппах АБА средней тяжести и АБА легкого течения. Статистическая значимость обнаруженных различий подтверждена при попарном межгрупповом сравнении тяжелой АБА с АБА средней тяжести и легкого течения ($p < 0,05$, U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Сходные результаты были получены при анализе группы НАБА. Наибольшими уровнями экспрессии FoxP3 характеризовалась группа НАБА средней тяжести, далее следовала группа НАБА легкого течения, имевшая уровни экспрессии в два раза ниже, чем группа НАБА. Минимальные

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FoxP3 (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Группа	Значение*	Достоверность различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n = 47 (1)	0,40 (0,08; 0,64)	$p_{1-2-3} = 0,082^{**}$ $p_{1-2-3} = 0,334^{**}$ $p_{1-2} = 0,240^{***}$ $p_{2-3} = 0,334^{***}$ $p_{1-3} = 0,025^{***}$
Больные АБА n = 42 (2)	0,21 (0,07; 0,63)	
Больные НАБА n = 40 (3)	0,16 (0,06; 0,45)	

Примечание. * – для выборок, характеризующихся распределением, отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** – для распределения, отличного от нормального, использован критерий независимых выборок Краскела–Уоллиса ($p = 0,082$) и критерий Джонкхиера–Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп ($p = 0,334$);

*** – уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FoxP3 У ПАЦИЕНТОВ С АБА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ (интегрированная плотность по отношению к β -актину)

Фаза	Значение*	Достоверность различий
АБА легкого течения (1) n = 7	0,33 (0,17; 0,79)	$p_{1-2-3} = 0,007^{**}$ $p_{1-2-3} = 0,003^{**}$ $p_{1-2} = 0,493^{***}$ $p_{2-3} = 0,002^{***}$ $p_{1-3} = 0,017^{***}$
АБА средней степени тяжести (2) n = 28	0,41 (0,92; 0,66)	
АБА тяжелого течения (3) n = 7	0,05 (0,02; 0,08)	

Примечание. * – для выборок, характеризующихся распределением, отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** – для распределения, отличного от нормального, использован критерий независимых выборок Краскела–Уоллиса ($p = 0,007$) и критерий Джонкхиера–Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп ($p = 0,003$);

*** – уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

уровни экспрессии FoxP3, как и в случае группы АБА, были выявлены у пациентов с тяжелым течением НАБА.

Далее для выявления возможных колебаний уровней FoxP3 на фоне терапии бронхиальной астмы рассмотрим влияние кортикостероидов на экспрессию FoxP3 (табл. 4, 5).

**ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FoxP3 У ПАЦИЕНТОВ
С НАБА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ЗАБОЛЕВАНИЯ
(интегрированная плотность по отношению к β -актину)**

Фаза	Значение*	Достоверность различий
НАБА легкого течения (1) n = 14	0,21 (0,09; 0,48)	$p_{1-2-3} = 0,002^{**}$ $p_{1-2-3} = 0,020^{**}$ $p_{1-2} = 0,423^{***}$ $p_{2-3} = 0,001^{***}$ $p_{1-3} = 0,0004^{***}$
НАБА средней степени тяжести (2) n = 19	0,42 (0,12; 0,50)	
НАБА тяжелого течения (3) n = 7	0,05 (0,01; 0,06)	

Примечание. * – для выборок, характеризующихся распределением, отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** – для распределения, отличного от нормального, использован критерий независимых выборок Краскела–Уоллиса ($p = 0,002$) и критерий Джонкхиера–Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп ($p = 0,020$);

*** – уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

**ТАБЛИЦА 4. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FoxP3
ПРИ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛУЧАЕМОЙ
КОРТИКОСТЕРОИДНОЙ ТЕРАПИИ (интегрированная
плотность по отношению к β -актину)**

Фаза	Значение*	Достоверность различий
Больные, не получающие ГКС терапию (1) n = 5	0,37 (0,15; 0,70)	$p_{1-2-3} = 0,469^{**}$ $p_{1-2-3} = 0,933^{**}$ $p_{1-2} = 0,331^{***}$ $p_{2-3} = 0,559^{***}$ $p_{1-3} = 0,310^{***}$
Больные, получающие иГКС терапию (2) n = 31	0,16 (0,05; 0,57)	
Больные, получающие терапию парентеральными ГКС (3) n = 44	0,15 (0,07; 0,50)	

Примечание. * – для выборок, характеризующихся распределением, отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** – для распределения, отличного от нормального, использован критерий независимых выборок Краскела–Уоллиса ($p = 0,469$) и критерий Джонкхиера–Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп ($p = 0,933$);

*** – уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

**ТАБЛИЦА 5. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ
ТРАНСКРИПЦИОННОГО ФАКТОРА FoxP3
ПРИ БА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ПОЛУЧАЕМОЙ
КОРТИКОСТЕРОИДНОЙ ТЕРАПИИ ПО ГРУППАМ АБА/
НАБА (интегрированная плотность по отношению
к β -актину)**

Фаза	Значение*	Достоверность различий
АБА		
Больные, получающие иГКС терапию (1) n = 14	0,26 (0,06; 0,64)	p ₁₋₂ = 0,978**
Больные, получающие терапию парентеральными ГКС (1) n = 23	0,19 (0,07; 0,63)	
НАБА		
Больные, получающие иГКС терапию (1) n = 17	0,16 (0,05; 0,50)	p ₁₋₂ = 0,654*
Больные, получающие терапию парентеральными ГКС (2) n = 21	0,15 (0,07; 0,46)	

Примечание. * – для выборок представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** – уровень значимости для сравнения двух независимых выборок, характеризующихся распределением, отличным от нормального (использован U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

**ТАБЛИЦА 6. КОНЦЕНТРАЦИИ ИНТЕРЛЕЙКИНА 17 (пг/мл)
У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И БОЛЬНЫХ БА**

Группа	Значение*	Достоверность различий
Контрольная группа (практически здоровые лица) n = 47 (1)	85,96 (19,51; 568,04)	$p_{1-2-3} = 0,081^{**}$ $p_{1-2-3} = 0,307^{**}$ $p_{1-2} = 0,261^{***}$ $p_{2-3} = 0,307^{***}$ $p_{1-3} = 0,024^{***}$
Больные АБА n = 42 (2)	211,85 (15,82; 1574,89)	
Больные НАБА n = 40 (3)	194,30 (61,20; 4682,86)	

Примечание. * – для выборок, характеризующихся распределением, отличным от нормального, представлены медианы и интерквартильные размахи (непараметрическая статистика);

** – для распределения, отличного от нормального, использован критерий независимых выборок Краскела–Уоллиса ($p = 0,081$) и критерий Джонкхиера–Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп ($p = 0,307$);

*** – уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

Анализ влияния ГКС терапии на уровни экспрессии FoxP3 в совокупной популяции больных БА показал, что наибольшими значениями показателя характеризовалась подгруппа пациентов, не получающих ГКС-терапию, при этом уровни экспрессии FoxP3 в группах ингаляционной и парентеральной ГКС терапии были практически в два раза меньше.

Дальнейший анализ в группах пациентов с АБА и НАБА подтвердил полученный результат: группа АБА характеризовалась несколько большими значениями FoxP3 в подгруппе пациентов, получавших иГКС-терапию, в группе НАБА экспрессия FoxP3 имела сопоставимые величины в подгруппах иГКС-терапии и в подгруппе парентеральной ГКС-терапии. Тем не менее статистическая достоверность выявленных различий не подтверждена как при анализе всей популяции больных БА в целом, так и при анализе подгрупп АБА и НАБА.

Учитывая, что FoxP3, согласно данным литературы [10, 11, 12], способен подавлять выработку IL-17 регуляторными клетками, представляет интерес проведенный нами корреляционный анализ между уровнями FoxP3 и IL-17 в группах АБА и НАБА, и были выявлены сильные корреляционные связи как в группе АБА ($r = -0,941$; $p < 0,0001$; $n = 42$) и НАБА ($r = -0,995$; $p < 0,0001$; $n = 40$).

В этой связи рассмотрим концентрации IL-17 у пациентов с бронхиальной астмой и практически здоровых лиц (табл. 6).

Как видно из таблицы 6, у больных бронхиальной астмой уровень IL-17 выше, чем у практически здоровых лиц, причем значимые различия были получены в группе больных НАБА.

При этом ранее было показано, что при бронхиальной астме высокий уровень экспрессии IL-17 отмечался у пациентов с низким содержанием Th2 и доминирующим нейтрофильным воспалением. Заболевание в данной популяции характеризовалось тяжелым течением и плохим ответом на терапию [2]. Предполагается, что влияние IL-17 может быть связано с развитием фиброза тканей дыхательных путей [1]. Кроме того, IL-17 способствует продукции целого ряда цитокинов, в частности IL-6, ускоряя процессы

ремоделирования и нарушая функции гладкомышечных клеток дыхательных путей [4].

Заключение

Нами проведено исследование экспрессии мРНК транскрипционного фактора FoxP3 в мононуклеарных клетках периферической крови по методу RT-PCR и выявлено снижение уровней экспрессии мРНК FoxP3 при АБА и НАБА по сравнению с группой практически здоровых лиц, вне зависимости от фазы БА, более значимое у больных НАБА.

У больных БА, получающих системные глюкокортикостероиды, также отмечается снижение экспрессии данного транскрипционного фактора, что, по-видимому, указывает на более тяжелое течение заболевания у этой категории обследованных (получающих системные ГКС). Исследование показало, что больные АБА и НАБА тяжелой степени тяжести имеют показатели экспрессии мРНК FoxP3 почти в 10 раз ниже, чем в контрольной группе, а у пациентов со средней и легкой степенями заболевания экспрессия мРНК FoxP3 значимо не отличается, что заставляет предполагать наличие выраженных нарушений регуляции экспрессии FoxP3 при утяжелении БА.

Это тем более важно, что, по данным литературы [5], при бронхиальной астме возможно развитие дисбаланса между FoxP3⁺Treg и Th17 в пользу повышения Th17 и снижения FoxP3⁺Treg клеток, что, в свою очередь может приводить к снижению экспрессии мРНК FoxP3 и повышению экспрессии IL-17 в мононуклеарах периферической крови, что было показано нами в данном исследовании.

Исходя из вышесказанного, снижение экспрессии мРНК FoxP3 в мононуклеарах периферической крови и повышение уровня IL-17 в сыворотке крови больных бронхиальной астмой может рассматриваться как проявление выраженного воспалительного процесса на фоне, вероятно, существующего дефекта регуляции экспрессии транскрипционного фактора FoxP3, что заставляет предполагать его ключевую роль в регуляции активности воспалительного процесса при бронхиальной астме.

Список литературы / References

1. Al-Muhsen S., Letuve S., Vazquez-Tello A., Pureza M.A., Al-Jahdali H., Bahammam A.S., Hamid Q., Halwani R. Th17 cytokines induce pro-fibrotic cytokines release from human eosinophils. *Respir. Res.*, 2013, Vol. 14, no. 1, p. 34.
2. Al-Ramli W., Préfontaine D., Chouiali F., Martin J.G., Olivenstein R., Lemièrre C., Hamid Q. T(H)17-associated cytokines (IL-17A and IL-17F) in severe asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 123, no. 5, pp. 1185-1187.
3. Bacchetta R., Barzaghi F., Roncarolo M.G. From IPEX syndrome to FOXP3 mutation: a lesson on immune dysregulation. *Ann N. Y. Acad. Sci.* 2016, Vol. 25.
4. Dragon S., Rahman M.S., Yang J., Unruh H., Halayko A.J., Gounni A.S. IL-17 enhances IL-1beta-mediated CXCL-8 release from human airway smooth muscle cells. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, 2007, Vol. 292, no. 4, pp. 1023-1029.

5. Jiang H., Wu X., Zhu H., Xie Y., Tang S., Jiang Y. FOXP3⁺Treg/Th17 cell imbalance in lung tissues of mice with asthma. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2015, Vol. 8, no. 3, pp. 4158-4163.
6. Kawaguchi K., Suzuki E., Yamaguchi A., Yamamoto M., Morita S., Toi M. Altered expression of major immune regulatory molecules in peripheral blood immune cells associated with breast cancer. *Breast Cancer*, 2016, Vol. 4.
7. Kim do H., Sohn J.H., Park H.J., Lee J.H., Park J.W., Choi J.M. CpG Oligodeoxynucleotide Inhibits Cockroach-Induced Asthma via Induction of IFN- γ ⁺ Th1 Cells or Foxp3⁺ Regulatory T Cells in the Lung. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2016, Vol. 8, no. 3, pp. 264-275.
8. Shim J.U., Rhee J.H., Jeong J.U., Koh Y.I. Flagellin Modulates the Function of Invariant NKT Cells From Patients With Asthma via Dendritic Cells. *Allergy Asthma Immunol. Res.*, 2016, Vol. 8, no. 3, pp. 206-215.
9. Stelmazczyk-Emmel A., Zawadzka-Krajewska A., Głodkowska-Mrówka E., Demkow U. FoxP3 Tregs Response to Sublingual Allergen Specific Immunotherapy in Children Depends on the Manifestation of Allergy. *J. Immunol. Res.*, 2015, Vol. 2015, p. 731381.
10. Tao B., Ruan G., Wang D., Li Y., Wang Z., Yin G. Imbalance of Peripheral Th17 and Regulatory T Cells in Children with Allergic Rhinitis and Bronchial Asthma. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2015, Vol. 14, no. 3, pp. 273-279.
11. Wan Y.Y., Flavell R.A. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature*, 2007, Vol. 445, no. 7129, pp. 766-770.
12. Zhou L., Lopes J.E., Chong M.M., Ivanov I.I., Min R., Vitoria G.D., Shen Y., Du J., Rubtsov Y.P., Rudensky A.Y., Ziegler S.F., Littman D.R. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgamma function. *Nature*, 2008, Vol. 453, no. 7192, pp. 236-240.

Авторы:

Еремеева А.В. — старший лаборант, кафедра госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Сорокина Л.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Минеев В.Н. — д.м.н., профессор, кафедра госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лим В.В. — к.м.н., старший лаборант, кафедра госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Нёма М.А. — к.м.н., ассистент, кафедра госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Трофимов В.И. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой госпитальной терапии с курсом аллергологии и иммунологии им. акад. М.В. Черноруцкого ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Eremeeva A.V., Senior Technician, M. Chernorutskyi Department of Hospital Therapy with a Course of Allergology and Immunology, First I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Lim V.V., PhD (Medicine), Senior Technician, M. Chernorutskyi Department of Hospital Therapy with a Course of Allergology and Immunology, First I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Nyoma M.A., PhD (Medicine), Assistant Professor, M. Chernorutskyi Department of Hospital Therapy with a Course of Allergology and Immunology, First I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Trofimov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, M. Chernorutskyi Department of Hospital Therapy with a Course of Allergology and Immunology, First I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 11.05.2016
Принята к печати 30.05.2016

Received 11.05.2016
Accepted 30.05.2016

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ У ЖЕНЩИН С ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И АДНЕКСИТОМ

Савченко А.А.^{1,2}, Каспаров Э.В.¹, Арутюнян С.С.¹, Борисов А.Г.^{1,2},
Кудрявцев И.В.^{3,4,5}, Мошев А.В.¹

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

² ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» МЗ РФ, г. Красноярск, Россия

³ ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

⁴ ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

⁵ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей фенотипического состава В-лимфоцитов в периферической крови у больных хроническим эндометритом и аднекситом. Обследовано 89 женщин репродуктивного возраста (от 18 до 45 лет) с хроническим эндометритом (48 чел.) и аднекситом (41 чел.). В качестве контроля обследовано 98 здоровых женщин аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипического состава В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител в следующих панелях: CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7. Обнаружено, что в периферической крови женщин с хроническими эндометритами и аднекситами значительно снижается содержание В-лимфоцитов. Понижение их количества определяется пониженными уровнями как В2- (основная фракция В-лимфоцитов), так и В1-клеток (минорная фракция), что определяет недостаточную реактивность специфического гуморального иммунитета, в том числе и на слизистых оболочках. Однако если при эндометрите наблюдается снижение только процентного количества В2-лимфоцитов, то при аднексите выявляется понижение и относительного, и абсолютного уровня содержания данной субпопуляции В-клеток. Особенностью фенотипического состава В-лимфоцитов при хронических эндометритах и аднекситах является также понижение содержания наивных В-лимфоцитов в крови. Причем у больных аднекситами уровень наивных В-клеток понижается более выражено, чем при эндометритах. В качестве функционального маркера В-лимфоцитов была исследована экспрессия CD23-антигена (низкоаффинный рецептор к IgE). Доказано, что у больных хроническими эндометритами в периферической крови снижается количество всех исследуемых субпопуляций В-лимфоцитов, экспрессирующих CD23. При хронических аднекситах у женщин количество различных фракций В-клеток, экспрессирующих CD23-антиген, также снижено, в том числе и относительно уровней, выявленных у больных хроническими эндометритами. Более выраженные нарушения со стороны В-клеточного иммунитета выявлены при хронических аднекситах, что связано с большей площадью локализации инфекционно-воспалительного процесса (задействована не только слизистая матки, но и придатков) и клиническим проявлением заболевания. Полученные результаты определяют необходимость оценки фенотипического состава В-лимфоцитов как маркеров неадекватного иммунного ответа при инфекционно-воспалительных заболеваниях органов малого таза и проведение эффективной иммунотерапии для повышения эффективности лечения.

Ключевые слова: В-лимфоциты, хронический эндометрит, хронический аднексит, субпопуляционный состав, противобактериальный иммунитет, низкоаффинный рецептор IgE

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.А. Савченко, Э.В. Каспаров, С.С. Арутюнян,
А.Г. Борисов, И.В. Кудрявцев, А.В. Мошев
«Фенотипический состав В-лимфоцитов у женщин
с хроническим эндометритом и аднекситом»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4. С. 379–384.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-379-384

© Савченко А.А. и соавт., 2016

For citation:

A.A. Savchenko, E.V. Kasparov, S.S. Arutyunyan, A.G.
Borisov, I.V. Kudryavtsev, A.V. Moshev "Phenotypic profile of
B-lymphocytes in women with chronic endometritis and adnexitis",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 4, pp. 379–384.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-379-384

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-379-384>

PHENOTYPIC PROFILE OF B-LYMPHOCYTES IN WOMEN WITH CHRONIC ENDOMETRITIS AND ADNEXITIS

Savchenko A.A.^{a, b}, Kasparov E.V.^a, Arutyunyan S.S.^a, Borisov A.G.^{a, b}, Kudryavtsev I.V.^{c, d, e}, Moshev A.V.^a

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

^b Krasnoyarsk V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

^d Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

^e Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. The aim of this study was to investigate phenotypic profile of B lymphocytes in peripheral blood of the patients with chronic endometritis and adnexitis. The study involved 89 women in their reproductive age (18 to 45 years) with chronic endometritis (48 cases) and adnexitis (41 cases). Ninety-eight healthy age-matched women participated as a control group. Phenotypic B-cell subpopulations were analyzed by flow cytometry performed with direct immunofluorescent staining of peripheral cells from whole blood using the following antibody panel: CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7. A significantly reduced B-lymphocyte content was revealed in peripheral blood of women with chronic endometritis and adnexitis. The reduced cell numbers occurred due to reduced B2 (main fraction of B-lymphocytes) and as B1 cells (minor fraction) which determines insufficient reactivity of specific humoral immune response, including immune reactions at the mucous membranes. However, percentage of B2-lymphocytes was decreased only in endometriosis, whereas patients with adnexitis showed decrease in both relative and absolute counts of this B cell subpopulation. A decreased content of naive B-cells in the peripheral blood is another feature of the B cell phenotypic profile in chronic endometritis and adnexitis. Moreover, the drop of the naive B-cell levels in patients with adnexitis proved to be more pronounced than in persons with endometritis. Expression of CD23-antigen (a low-affinity receptor for IgE) has been investigated as a functional marker of B cells. All the studied peripheral B cell subpopulations expressing CD23 were decreased in the patients with chronic endometritis. The numbers of different B cell fractions expressing CD23 antigen were also reduced in the women with chronic adnexitis as compared to the levels detected in patients with chronic endometritis. Alterations of the B-cell immunity were more pronounced in chronic adnexitis, due to more extensive infectious/inflammatory process which involved both endometrium, and appendages, and clinical manifestation of the disease. The results suggest a need for evaluation of the B cell phenotypic profiles as a marker of inadequate immune response in infectious and inflammatory diseases of pelvic organs, as well as planning rational immunotherapy, in order to enhance therapeutic efficiency in these disorders.

Keywords: B-lymphocytes, chronic endometritis, chronic adnexitis, subpopulation structure, antibacterial immunity, low-affinity IgE receptor

Введение

Острый и хронический эндометрит и аднексит занимают лидирующее положение в структуре воспалительных заболеваний органов малого таза и вообще всей гинекологической заболеваемости. Они являются наиболее частой причиной тяжелой гинекологической гнойно-септической патологии, такой как tuboовариальный абсцесс и перитонит [4, 7]. Нередким исходом этих заболеваний становится спаечный процесс, бесплодие, невынашивание беременности и хроническая тазовая боль [3]. В основе патогенеза этих заболеваний лежит инфекционный процесс, обычно возникающий в результате восходящей инфекции из цервикального канала [4, 7]. Нарушение биоциноза влагалища, длительная персистенция патогенных микроорганизмов (гонорея, трихомониаз, хламидии и пр.), неадекватная реакция иммунной системы приводит к нарушению тканевого гомеостаза и формированию каскада вторичных воспалитель-

ных повреждений с развитием прогрессирования заболевания от эндометрита к сальпингиту и оофориту [12, 14]. Важная роль в основе патогенеза этих заболеваний принадлежит иммунной системе, и прежде всего ее гуморальному звену, так как основным источником повреждения эндометрия является бактериальная инфекция и сопряженный с ней неадекватный гуморальный иммунный ответ. Реактивность гуморального звена иммунной системы во многом определяется субпопуляционным составом В-лимфоцитов. При этом, если при некоторых воспалительных заболеваниях фенотипический состав В-клеток изучается, то при хронических эндометритах и аднекситах роль В-лимфоцитов практически не исследована [8, 9, 13].

Целью исследования явилось изучение особенностей фенотипического состава В-лимфоцитов в периферической крови у больных хроническим эндометритом и аднекситом.

Материалы и методы

Обследовано 89 женщин репродуктивного возраста (от 18 до 45 лет) с хроническим эндометритом (48 чел.) и аднекситом (41 чел.). Проводилось комплексное обследование, включающее расширенную кольпоскопию, цитологические и морфологические методы. Также проведена клиническая оценка иммунных нарушений [1]. В качестве контроля обследовано 98 здоровых женщин аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипического состава В-лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных FITC (fluorescein isothiocyanate), PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующих панелях: CD5-FITC/CD23-PE/CD19-ECD/CD45-PC5/CD27-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [2]. Пробоподготовку осуществляли по стандартной методике [11]. Лизис эритроцитов

проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA) [5, 10]. В каждой пробе анализировали не менее 50 000 лимфоцитов.

Все исследования выполнены с информированного согласия испытуемых и в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2013 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ от 19.06.2003 г. № 266.

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При исследовании фенотипического состава В-лимфоцитов крови у женщин с инфекционно-

ТАБЛИЦА 1. СУБПОПУЛЯЦИОННЫЙ СОСТАВ В-ЛИМФОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И АДНЕКСИТОМ (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели	Контроль n = 98		Эндометрит n = 48		Аднексит n = 41	
	1		2		3	
	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$
CD19 ⁺ , %	13,0	9,4-16,0	9,4	7,0-11,9	8,7	5,0-11,3
CD19 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,26	0,18-0,35	0,21	0,14-0,27	$p_{1-2} < 0,001$	
					$p_{1-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , %	10,2	8,3-12,4	8,5	6,1-10,5	$p_{1-2} = 0,006$	
					$p_{1-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD5 ⁻ , 10 ⁹ /л	0,19	0,16-0,24	0,17	0,12-0,22	$p_{1-2} = 0,010$	
					$p_{1-3} = 0,001$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , %	1,6	1,2-2,7	1,2	0,6-2,2	$p_{1-2} = 0,012$	
					$p_{1-3} = 0,013$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,03	0,02-0,05	0,03	0,01-0,04	$p_{1-2} = 0,048$	
					$p_{1-3} = 0,013$	
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , %	9,5	7,7-12,0	7,4	4,8-8,4	$p_{1-2} = 0,033$	
					$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,044$	
CD19 ⁺ CD27 ⁻ , 10 ⁹ /л	0,17	0,14-0,24	0,15	0,10-0,21	$p_{1-2} < 0,001$	
					$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,012$	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , %	2,3	1,6-3,2	2,4	1,9-3,0	2,5	1,8-3,3
CD19 ⁺ CD27 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,04	0,03-0,07	0,05	0,04-0,08	0,05	0,04-0,09

Примечание. p_1 – статистически значимые различия с контрольными показателями; p_2 – статистически значимые различия с показателями больных эндометритом.

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ В-ЛИМФОЦИТОВ, ЭКСПРЕССИРУЮЩИХ НИЗКОАФФИННЫЙ РЕЦЕПТОР ДЛЯ IgE, У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЭНДОМЕТРИТОМ И АДНЕКСИТОМ (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели	Контроль n = 98		Эндометрит n = 48		Аднексит n = 41	
	1		2		3	
	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$
CD19 ⁺ CD23 ⁺ , %	12,1	9,6-13,7	5,7	4,3-7,4	3,8	2,3-5,5
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3, 2-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD23 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,21	0,18-0,30	0,13	0,09-0,18	0,07	0,03-0,13
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3, 2-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , %	9,3	7,5-11,7	4,6	3,2-5,9	3,0	1,7-4,7
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} = 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,17	0,15-0,23	0,11	0,07-0,14	0,06	0,02-0,10
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3, 2-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , %	1,5	1,0-2,6	1,0	0,5-1,7	0,6	0,4-1,2
			$p_{1-2} = 0,011$		$p_{1-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD5 ⁺ CD23 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,03	0,02-0,05	0,03	0,01-0,04	0,01	0,01-0,02
					$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,039$	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , %	9,0	6,8-11,5	4,9	3,3-6,6	3,0	1,4-4,8
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3, 2-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,16	0,13-0,23	0,11	0,07-0,16	0,05	0,02-0,10
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3, 2-3} < 0,001$	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , %	1,9	1,1-2,6	0,7	0,4-0,9	0,5	0,3-0,6
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,027$	
CD19 ⁺ CD27 ⁺ CD23 ⁺ , 10 ⁹ /л	0,04	0,03-0,07	0,014	0,009-0,021	0,008	0,006-0,017
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,039$	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

воспалительными заболеваниями органов малого таза обнаружено, что относительно контрольных значений и независимо от заболевания снижается процентное и абсолютное количество CD19⁺ клеток (табл. 1). Также независимо от зоны воспаления снижается относительное содержание CD19⁺CD5⁻ и CD19⁺CD5⁺ лимфоцитов. В то же время, абсолютный уровень CD19⁺CD5⁻ лимфоцитов понижается только при хронических аднекситах. Процентное и абсолютное количество CD19⁺CD27⁻ лимфоцитов снижается и у женщин с хроническим эндометритом, и хроническим аднекситом, но при хроническом воспалении придатков матки понижение уровня В-лимфоцитов с данным фенотипом статистически более выражено, чем при хроническом воспалении слизистой оболочки матки.

Процентное и абсолютное количество CD19⁺ лимфоцитов, экспрессирующих CD23, снижено у женщин с инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза, но при хроническом аднексите содержание CD19⁺CD23⁺ клеток значительно понижено по сравнению с уровнем,

выявленным у пациенток с хроническим эндометритом (табл. 2). Аналогичным образом характеризуется относительное и абсолютное содержание CD19⁺CD5⁺CD23⁺, CD19⁺CD27⁺CD23⁺ и CD19⁺CD27⁺CD23⁺ лимфоцитов у женщин с хроническим эндометритом и аднекситом. Процентный уровень CD19⁺CD5⁺CD23⁺ клеток у больных с инфекционно-воспалительными заболеваниями органов малого таза снижен относительно контрольных значений независимо от заболеваний, однако абсолютное количество клеток с данным фенотипом снижено только при хроническом аднексите.

Обсуждение

По мнению ряда авторов, основную роль в развитии эндометритов и аднекситов играет не только фактор инфицирования, но и не способность иммунной системы женщины к локализации очага возможной бактериальной агрессии и элиминации патогена [4, 7]. Следовательно, устойчивость организма к бактериальным инфекциям в значительной мере будет обусловлена

функциональным состоянием В-лимфоцитов. Обнаружено, что в периферической крови женщин с хроническими эндометритами и аднекситами значительно снижается содержание В-лимфоцитов. Понижение их количества определяется пониженными уровнями как В2- (основная фракция В-лимфоцитов), так и В1-клеток (минорная фракция). Однако если при эндометритом наблюдается снижение только процентного количества В2-лимфоцитов, то при аднексите выявляется понижение и относительного и абсолютного уровня содержания данной субпопуляции В-клеток. Необходимо отметить, что В1-лимфоциты локализуются преимущественно в брюшной и плевральной полостях, синтезируют IgM и IgA к бактериальным антигенам [6]. Особенностью В1-клеток также является их способность выполнять роль антигенпрезентирующих клеток. Следовательно, при хронических эндометритах и аднекситах снижается реактивность специфического гуморального иммунитета, в том числе и на слизистых оболочках. Кроме того, при хронических воспалительных заболеваниях органов малого таза у женщин в периферической крови снижается процентное и абсолютное количество наивных В-лимфоцитов. Причем у больных аднекситами уровень наивных В-клеток понижается более выражено, чем при эндометритах.

В качестве функционального маркера В-лимфоцитов была исследована экспрессия CD23-антигена. Данная молекула представляет собой низкоаффинный рецептор к IgE [15]. Установле-

но, что у больных хроническими эндометритами в периферической крови снижается количество всех исследуемых субпопуляций В-лимфоцитов, экспрессирующих CD23. При хронических аднекситах у женщин количество различных фракций В-клеток также снижено, в том числе и относительно уровней, выявленных у больных хроническими эндометритами.

Таким образом, при инфекционно-воспалительных заболеваниях органов малого таза в периферической крови у женщин снижено количество В-лимфоцитов за счет фракций В2- и В1-клеток, что определяет недостаточную реактивность специфического гуморального иммунитета, в том числе и на слизистых оболочках. Особенностью фенотипического состава В-лимфоцитов при хронических эндометритах и аднекситах является снижение содержания наивных В-лимфоцитов в крови и понижение содержания всех субпопуляций В-клеток с экспрессией CD23-маркера. Более выраженные нарушения со стороны В-клеточного иммунитета выявлены при хронических аднекситах, что связано с большей площадью локализации инфекционно-воспалительного процесса (задействована не только слизистая матки, но и придатков) и клиническим проявлением заболевания. Полученные результаты определяют необходимость оценки фенотипического состава В-лимфоцитов как маркеров неадекватного иммунного ответа при инфекционно-воспалительных заболеваниях органов малого таза и проведение эффективной иммунотерапии для повышения эффективности лечения.

Список литературы / References

1. Борисов А.Г. Клиническая характеристика нарушения функции иммунной системы) // Медицинская иммунология, 2013. Т. 15, № 1. С. 45-50. [Borisov A.G. Clinical characterization of functional disorders affecting immune system. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 1, pp. 45-50. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2013-1-45-50>
2. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шести-цветного цитофлуориметрического анализа // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>
3. Мальцева Л.И., Смолина Г.Р., Шарипова Р.И., Багаева М.И., Петрянина Е.В., Стовбун С.В. Хронический эндометрит в практике акушера-гинеколога // Российский вестник акушера-гинеколога, 2015. Т. 15, № 5. С. 102-105. [Maltseva L.I., Smolina G.R., Sharipova R.I., Bagaeva M.I., Petrjanina E.V., Stovbun S.V. Chronic endometritis in the practice of an obstetrician/gynecologist. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin of Obstetrician-Gynecologist*, 2015, Vol. 15, no. 5, pp. 102-105. (In Russ.)]
4. Муравьева В.В., Припутневич Т.В., Якушевская О.В., Чернуха Г.Е., Марченко Л.А., Анкирская А.С., Любасовская Л.А., Мелкумян А.Р. Роль условно-патогенных микроорганизмов в этиологии хронического эндометрита у женщин репродуктивного возраста // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2015. Т. 17, № 4. С. 318-327. [Muravyeva V.V., Priputnevich T.V., Yakushevskaya O.V., Chernukha G.E., Marchenko L.A., Ankirskaya A.S., Ljubasovskaya L.A., Melkumian A.R. The role of the opportunistic pathogens in the etiology of chronic endometritis in women of reproductive age. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 318-327. (In Russ.)]
5. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft).

Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>

6. Amezcua Vesely M.C., Schwartz M., Bermejo D.A., Montes C.L., Cautivo K.M., Kalergis A.M., Rawlings D.J., Acosta-Rodriguez E.V., Gruppi A. FcγRIIb and BAFF differentially regulate peritoneal B1 cell survival. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 10, pp. 4792-4800.

7. Beruchashvili M., Gogiashvili L., Datunashvili E., Topuria Z., Tsagareli Z. Morphological peculiarities of endometrium in chronic endometritis associated with bacterial vaginosis. *Georgian Med. News*, 2010, Vol. 181, pp. 59-63.

8. Braza F., Chesne J., Durand M., Dirou S., Brosseau C., Mahay G., Cheminant M.A., Magnan A., Brouard S. A regulatory CD9(+) B-cell subset inhibits HDM-induced allergic airway inflammation. *Allergy*, 2015, Vol. 70, no. 11, pp. 1421-1431.

9. Kitaya K., Yasuo T. Aberrant expression of selectin E, CXCL1, and CXCL13 in chronic endometritis. *Mod. Pathol.*, 2010, Vol. 23, no. 8, pp. 1136-1146.

10. Luider J.I., Cyfra M., Johnson P., Auer I. Impact of the new Beckman Coulter Cytomics FC 500 5-color flow cytometer on a regional flow cytometry clinical laboratory service. *Lab. Hematol.*, 2004, Vol. 10, pp. 102-108.

11. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.

12. Pittrof R., Sully E., Bass D.C., Kelsey S.F., Ness R.B., Haggerty C.L. Stimulating an immune response? Oral sex is associated with less endometritis. *Int. J. STD AIDS*, 2012, Vol. 23, no. 11, pp. 775-780.

13. Pore D., Matsui K., Parameswaran N., Gupta N. Cutting Edge: Ezrin Regulates Inflammation by Limiting B Cell IL-10 Production. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 196, no. 2, pp. 558-562.

14. Potter T.J., Guitian J., Fishwick J., Gordon P.J., Sheldon I.M. Risk factors for clinical endometritis in postpartum dairy cattle. *Theriogenology*, 2010, Vol. 74, no. 1, pp. 127-134.

15. Sutton B.J., Davies A.M. Structure and dynamics of IgE-receptor interactions: FcεRI and CD23/FcεRII. *Immunol. Rev.*, 2015, Vol. 268, no. 1, pp. 222-235.

Авторы:

Савченко А.А. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Каспаров Э.В. — д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Арутюнян С.С. — аспирант ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Борисов А.Г. — к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Кудрявцев И.В. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург; ФГАОУ ВПО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Мошев А.В. — младший научный сотрудник лаборатории молекулярно-клеточной физиологии и патологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Authors:

Savchenko A.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North; Krasnoyarsk V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kasparov E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Arutyunyan S.S., Postgraduate Student, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Borisov A.G., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North; Krasnoyarsk V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kudryavtsev I.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg; Far Eastern Federal University, Vladivostok; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Moshev A.V., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular and Cellular Physiology and Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 14.04.2016

Отправлена на доработку 31.05.2016

Принята к печати 20.06.2016

Received 14.04.2016

Revision received 31.05.2016

Accepted 20.06.2016

ИММУНОМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА

Самойлович М.П.^{1,3}, Грязева И.В.¹, Мазинг А.В.², Лапин С.В.²,
Климович В.Б.¹

¹ ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Россия

Резюме. Выявление свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов (Ig) и их соотношения (каппа/лямбда коэффициент) используют при диагностике и мониторинге миеломной болезни и других гаммапатий, первичного амилоидоза и рассеянного склероза. Разработанный ранее метод детекции СЛЦ, основанный на применении моноклональных антител (МКАТ) против криптопических и постоянно экспонируемых эпитопов СЛЦ, не обеспечивал выявления редких вариантов белков Бенс-Джонса лямбда-типа и значительной части свободных лямбда-цепей, экскретируемых с мочой. Для усовершенствования метода использовано новое МКАТ (1C8) изотипа IgG2b, которое связывает СЛЦ лямбда-типа, но не взаимодействует с целостными молекулами IgG, IgA и IgM. МКАТ распознает эпитоп лямбда цепей, который присутствует на антигене в циркулирующей крови здоровых доноров и пациентов с миеломной болезнью, не разрушается и не маскируется в процессе почечной фильтрации. Цель исследования состояла в определении основных характеристик новой системы и в оценке ее диагностических возможностей при выявлении моноклональных гаммапатий. В качестве калибраторов использованы смеси белков Бенс-Джонса каппа- или лямбда-типа, выделенных из мочи пациентов с миеломной болезнью. Предложенный метод позволяет выявлять в сыворотке и в моче СЛЦ каппа- и лямбда-типа в интервале концентраций от 1 до 100 нг/мл, что на три порядка превышает возможности метода Freelite, основанного на использовании поликлональных антител. Предложенный метод позволяет выявлять сопоставимые концентрации СЛЦ и вычислять коэффициент каппа/лямбда. Метод обеспечивает выявление в сыворотке и моче СЛЦ в присутствии 10-тысячекратного избытка целостных молекул IgG. Калибровочные графики для определения концентраций СЛЦ обоих типов имеют в логарифмической системе координат вид линейных зависимостей с одинаковым углом наклона. Порог детекции СЛЦ каппа- и лямбда-типа равен 5 и 3 нг/мл соответственно. В сыворотках крови здоровых доноров средние величины концентраций ($M \pm SD$) свободных каппа-цепей составили $6,7 \pm 2,1$, в моче — $4,2 \pm 3,8$ мкг/мл. Соответствующие значения для лямбда-цепей составили $4,7 \pm 1,96$ и $1,6 \pm 1,0$ мкг/мл. Величины коэффициентов каппа/лямбда в сыворотке крови и моче сопоставимы с данными, приводимыми в литературе. В сыворотках и моче пациентов с множественной миеломой выявлены моноклональные СЛЦ того же типа, что и парапротеин, обнаруженный в сыво-

Адрес для переписки:

Климович Владимир Борисович
ФГБУ «Российский научный центр радиологии
и хирургических технологий»
197136, Россия, Санкт-Петербург,
ул. Гатчинская, 9, кв. 18.
Тел.: 8 (921) 954-44-87.
E-mail: vklimovich@gmail.com

Address for correspondence:

Klimovich Vladimir B.
Russian Research Center for Radiology and Surgical
Technologies, St. Petersburg, Russian Federation
197136, Russian Federation, St. Petersburg,
Gatchinskaya str. 9, apt 18.
Phone: 7 (921) 954-44-87.
E-mail: vklimovich@gmail.com

Образец цитирования:

М.П. Самойлович, И.В. Грязева, А.В. Мазинг, С.В. Лапин,
В.Б. Климович «Иммунометрический метод определения
концентраций свободных легких цепей иммуноглобулинов
человека» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 4.
С. 385–394. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-385-394

© Самойлович М.П. и соавт., 2016

For citation:

M.P. Samoylovich, I.V. Griaeva, A.V. Mazing, S.V. Lapin,
V.B. Klimovich "Immunometric assay to determine free light chain
concentrations of human immunoglobulins", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 4,
pp. 385–394. doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-385-394

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-4-385-394>

ротке крови с помощью электрофореза с последующей иммунофиксацией. Значения коэффициентов каппа/лямбда при этом соответствовали типу выявленной гаммапатии.

Ключевые слова: свободные легкие цепи, Ig, белки Бенс-Джонса, гаммапатии, иммуноферментный анализ, моноклональные антитела, сыворотка крови, моча

IMMUNOMETRIC ASSAY TO DETERMINE FREE LIGHT CHAIN CONCENTRATIONS OF HUMAN IMMUNOGLOBULINS

Samoylovich M.P.^{a,c}, Griaeva I.V.^a, Mazing A.V.^b, Lapin S.V.^b, Klimovich V.B.^a

^a Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

^b First I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Detection of total free light chains (FLC) of immunoglobulins and their ratio (kappa/lambda quotient) are used in diagnostics and monitoring of multiple myeloma and other gammopathies, primary amyloidosis and multiple sclerosis. Previously described immunoassays with monoclonal antibodies (Mabs) against cryptic and constantly exposed epitopes of FLC failed to recognize rare variants of lambda Bence-Jones proteins and a significant proportion of lambda chains excreted with urine. Aiming to improve this approach, a novel murine Mab (IgG2b coded as 1C8) was employed, which specifically binds free lambda chains but doesn't interact with native IgA, IgG, and IgM. The novel Mab recognized an epitope exposed at free lambda chains in peripheral blood of healthy donors and patients with multiple myeloma. It is not destroyed or masked upon renal filtration.

The aim of this study was to determine basic features of improved assay system, and to estimate its potential in diagnostics of monoclonal gammopathies. The mixtures of three Bence-Jones proteins of either kappa- or lambda- types purified from the urine of multiple myeloma patients were used as calibrator samples.

Improved immunometric assay is able to detect free kappa and lambda chains in serum and urine at a scale of 1 to 100 ng/ml, thus being three orders more sensitive than, e.g., detection levels of Freelite method based on polyclonal antibodies.

A novel assay allows to detect free kappa and lambda chains at comparable levels in serum or urine, and to deduce kappa/lambda ratio. The proposed assay is able to detect FLC in 10,000-fold excess of whole IgG molecules. The calibrating plots for both antigens are linear on log-log scales, with very similar slopes. Detection thresholds for kappa or lambda chains proved to be 5 and 3 ng/ml, respectively. Mean concentrations of free kappa chains in sera of healthy donors were 6.7 ± 2.1 , in urine, 4.2 ± 3.8 mcg/ml. Mean concentrations of free lambda chains were 4.7 ± 1.96 , and 1.6 ± 1.0 mcg/ml, respectively. This method, if applied to serum and urine samples from multiple myeloma patients, revealed free light chains were similar to the paraproteins detected by means of electrophoresis/immunofixation. The values of kappa/lambda ratios corresponded to the types of gammopathies revealed.

Keywords: immunoglobulin, free light chains, Bence-Jones proteins, gammopathies, immunoenzyme assay, monoclonal antibodies, serum, urine

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение №16-15-00118).

Введение

Выявление в биологических жидкостях моно- или олигоклональных свободных легких цепей (СЛЦ) иммуноглобулинов (Ig) и их соотношения (каппа/лямбда коэффициент) используют при диагностике и мониторинге миеломной болезни и других гаммапатий [19, 13], первичного амило-

идоза [27] и рассеянного склероза [17, 25]. В последние годы рассматривается вопрос о целесообразности выявления поликлональных СЛЦ при воспалительных и аутоиммунных заболеваниях [8].

Молекулы СЛЦ несут антигенные детерминанты (эпитопы) двух категорий. Первые, экспонируемые постоянно, распознаются специфическими антителами независимо от того, входят ли легкие цепи в состав Ig или существуют в виде отдельных молекул. Эпитопы второго типа называют криптоическими, т.к. в полных молекулах

Ig они маскируются прилегающими участками тяжелых цепей [15, 21]. Наличие на антигене двух топографически удаленных эпитопов является предпосылкой создания иммунометрического метода детекции [14], который по уровню специфичности и чувствительности превосходит другие методы иммуноанализа. Применительно к детекции СЛЦ иммунометрический анализ [7] предполагает сочетанное использование двух антител, одно из которых, направленное к криптической детерминанте, адсорбировано на твердой фазе и служит для извлечения СЛЦ из пробы. Второе антитело, распознающее постоянно экспонируемый эпитоп, используют в виде меченого реагента для выявления образованного на твердой фазе иммунного комплекса. Преимущество иммунометрического метода состоит в высокой специфичности за счет одновременного распознавания двух эпитопов одной молекулы. Метод позволяет выявлять низкие концентрации СЛЦ вне зависимости от присутствия в пробе целостных молекул Ig.

На протяжении последних двух десятилетий было предпринято несколько попыток создания иммунометрических систем на основе моноклональных антител (МКАТ) против постоянно экспонируемых и криптических эпитопов СЛЦ [5, 20, 22]. Эффективность предложенных систем не достигала желаемого уровня. В частности, метод, предложенный американскими авторами [12], оказался чрезмерно трудоемким. Разработанная ранее система на основе МКАТ, созданных в лаборатории гибридной технологии [1], выявляла в сыворотках пациентов с миеломной болезнью не все встречающиеся варианты лямбда-цепей. Кроме того, концентрация лямбда-цепей, определяемая в моче, была на 2 порядка ниже уровня каппа-цепей, что исключало корректное определение коэффициента каппа/лямбда. Из этого следовало, что в первых попытках по созданию гибридом не удалось найти МКАТ к криптическому эпитопу лямбда-цепей, который присутствовал бы на подавляющем большинстве молекул этого типа и сохранялся бы на них в процессе почечной фильтрации. С подобной проблемой сталкивались и авторы аналогичных разработок [22].

В ходе попыток усовершенствовать предложенную ранее систему было получено новое МКАТ против криптического эпитопа лямбда-цепей, которое не связывало молекулы целостных Ig. На его основе был разработан метод детекции СЛЦ лямбда-типа, который, в сочетании с ранее предложенной методикой выявления СЛЦ каппа-типа, составил единую аналитическую систему определения концентраций СЛЦ в биологических жидкостях человека.

Цель настоящей работы состояла в определении основных параметров усовершенствованной системы и в оценке возможностей ее применения при оценке уровня СЛЦ у здоровых лиц и при диагностике моноклональных гаммапатий.

Материалы и методы

Образцы биологических жидкостей

В работе использованы образцы сывороток крови 30 здоровых доноров в возрасте от 25 до 73 лет. От 23 доноров были получены образцы утренней мочи. Были исследованы также 34 парных образца сыворотки крови и мочи пациентов с миеломной болезнью, у которых присутствие моноклональных Ig в крови и моче было установлено с помощью методов электрофореза и иммунофиксации с использованием реагентов и оборудования фирмы Helena Bioscience (Великобритания). До исследования все образцы хранили при -70°C .

При установлении специфичности полученных МКАТ были использованы образцы парапротеинов и белков Бенс-Джонса (ББД) от пациентов с миеломной болезнью из собранной в лаборатории коллекции. Изотипы парапротеинов и характеристики ББД были определены с помощью полученных в лаборатории МКАТ против тяжелых и легких цепей Ig человека [3].

Из мочи больных множественной миеломой ББД выделяли концентрированием с помощью ультрафильтрации с последующим осаждением сульфатом аммония при 75%-ном насыщении и ионообменной хроматографии на колонке с ДЭАЭ-Сефацелом. Поликлональный IgG выделяли из глобулиновой фракции донорской плазмы также с помощью ионообменной хроматографии. Для освобождения от возможных примесей СЛЦ препарат дополнительно подвергали очистке на колонке с протеин G-сефарозой (GE Healthcare, США). Поликлональные легкие цепи получали фрагментированием очищенного IgG человека путем восстановления дисульфидных связей 2-меркаптоэтанолом, последующего алкилирования иодацетамидом и разделения легких и тяжелых цепей с помощью гель-хроматографии на Сефадексе G-75.

Поликлональные IgG, IgA и IgM получали из пула донорских сывороток с помощью аффинной хроматографии, используя протеин A-сефарозу (GE Healthcare, США) и иммуносорбенты на основе МКАТ против IgA, IgM [2] и четырех подклассов IgG [4]. При оценке специфичности выявления СЛЦ использовали коммерческие препараты IgG человека для внутривенного введения Пентаглобин (Октафарм, Германия) и Иммуновенин (Микроген, Россия).

Получение МКАТ против постоянно экспонируемых эпитопов каппа- (4G7) и лямбда-цепей (2G9), а также против криптоического эпитопа каппа-цепей (4C11) было описано ранее [1]. В качестве антигенов при иммунизации мышей, при отборе гибридом, продуцирующих МКАТ, а также при изучении специфичности МКАТ использовали ББД каппа- и лямбда-типа. В качестве отрицательных контролей применяли поликлональный IgG человека и препараты аффинно очищенных поликлональных IgA, IgM и IgG.

При создании новых штаммов гибридом-продуцентов МКАТ против криптоического эпитопа лямбда-цепей были использованы описанные ранее [1] методы. Отличие нового цикла получения МКАТ состояло в том, что иммуногеном служила смесь шести образцов ББД лямбда-типа, которые не взаимодействовали с полученным ранее МКАТ (3D12) против криптоического эпитопа лямбда-цепей. Перед введением животным смесь белков денатурировали нагреванием при 56 °C в 2М ацетатном буфере, pH = 4,9 [6]. При скрининге гибридом использовали нативные ББД лямбда-типа, которые не входили в состав иммунизирующей смеси. Второе отличие нового цикла создания гибридом состояло в том, что партнером при гибридизации с лимфоцитами служила клеточная линия мышинной плазматомы SP-2/0.

Тестирование надосадочных жидкостей из культур с гибридомными клетками для выявления антител к лямбда-цепям проводили трижды, начиная с 10-го дня после слияния. При этом использовали два метода твердофазного иммуноферментного анализа. Первый из них заключался в иммобилизации на твердой фазе ББД или интактных Ig. Связанные с антигеном антитела выявляли с помощью меченных пероксидазой кроличьих антител против иммуноглобулинов мыши. Во втором методе немеченные кроличьи антитела против Ig мыши адсорбировали на твердой фазе и использовали для захвата антител из культуральной среды, а для выявления связавшихся антител использовали меченные пероксидазой ББД лямбда-типа, IgG или IgA.

Культуры гибридных клеток искомой специфичности клонировали трижды методом лимитирующих разведений на фидерном слое из перитонеальных макрофагов. Затем гибридомы выращивали в массовых культурах и вводили внутрибрюшинно мышам, получившим за 7 дней до прививки инъекцию 0,5 мл пристана. Асцитические жидкости получали через 10-20 дней после инъекции клеток. Выделение МКАТ из асцитической жидкости осуществляли путем осаждения сульфатом аммония при 40%-ном насыщении с последующей аффинной хроматографией на протеин-G-сефарозе (GE Healthcare, США).

При разработке иммунометрических систем определения концентраций СЛЦ в лунки 96-луночных полистироловых планшетов (NUNC Maxisorp, Дания) вносили по 100 мкл растворов МКАТ (10 мкг/мл) против криптоических эпитопов свободных каппа- или лямбда-цепей (4C11 и 1C8 соответственно) в 0,1 М бикарбонатном буфере (pH = 9,5) и инкубировали при 4 °C в течение 18 часов. Затем промывали 3 раза фосфатно-солевым раствором (pH = 7,4), содержащим 0,1% Твин-20 (ФСР-Т). Вносили по 100 мкл образцов сыворотки, мочи или стандартных калибрующих растворов. Образцы сыворотки разводили ФСР-Т в соотношениях 1:50, 1:100 и 1:300, а образцы мочи — 1:10, 1:30 и 1:90. В качестве калибраторов использовали смеси из трех ББД лямбда- или каппа-типа, взятых в равных количествах. Для построения калибровочных графиков, определения чувствительности метода и подбора оптимальных концентраций калибрующих проб готовили стандартные разведения, содержащие от 1000 до 0,1 нг/мл ББД каппа- или лямбда-типа. Пробы инкубировали 1,5 часа при 37 °C, промывали 3 раза ФСР-Т и вносили растворы конъюгированных с пероксидазой МКАТ против постоянно экспонированных эпитопов каппа- или лямбда-цепей (4G7 или 2G9 соответственно) [1]. Инкубировали при 37 °C в течение 1 часа, промывали и вносили раствор тетраметилбензидина (Хема, Россия). Реакцию останавливали через 10 мин добавлением 50 мкл 1N H₂SO₄. Результаты регистрировали на планшетном фотометре при длине волны 450 нм.

Для определения метрологических характеристик системы каждую серию экспериментов выполняли в трех-десяти независимых повторях. При статистической обработке данных использовали стандартные возможности программного обеспечения "Microsoft Office". Вычисляли средние величины и стандартные отклонения. Уровень статистической значимости принимали равным менее 0,05.

Результаты

Эксперимент по гибридизации позволил получить 80 культур гибридомных клеток, продуцирующих МКАТ против лямбда-цепей. Для дальнейшей работы был отобран штамм с кодовым обозначением 1C8. Синтезируемые этим штаммом МКАТ (изотип IgG2b) связывали все испытанные препараты ББД лямбда-типа и не проявляли перекрестной реактивности с целостными молекулами IgG, IgA и IgM (табл. 1). Поскольку новое МКАТ сохраняло высокую антиген-связывающую активность при иммобилизации на твер-

ТАБЛИЦА 1. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ МКАТ ПРОТИВ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ С МИЕЛОМНЫМИ ПАРАПРОТЕИНАМИ, БЕЛКАМИ БЕНС-ДЖОНСА И ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ ИММУНОГЛОБУЛИНАМИ

Миеломные белки и белки Бенс-Джонса*	Количество образцов, взаимодействующих с			
	МКАТ против каппа-цепи		МКАТ против лямбда-цепи	
	4G7**	4C11**	2G9**	1C8
IgG _κ (n = 15)	15	0	0	0
IgG _λ (n = 10)	0	0	10	0
IgM _κ (n = 2)	2	0	0	0
IgM _λ (n = 2)	0	0	2	0
IgA1 _κ (n = 8)	8	0	0	0
IgA1 _λ (n = 4)	0	0	4	0
IgA2 _κ (n = 1)	1	0	0	0
IgA2 _λ (n = 2)	0	0	2	0
IgD _κ (n = 1)	1	0	0	0
ББД _κ (n = 12)	12	12	0	0
ББД _λ (n = 11)		0	11	11
Поликлональные				
Легкие цепи (κ+λ)	+	+	+	+
IgG	+	–	+	–
IgA	+	–	+	–
IgM	+	–	+	–

Примечание. * – в скобках указано число испытанных образцов; ** – по данным публикации [1].

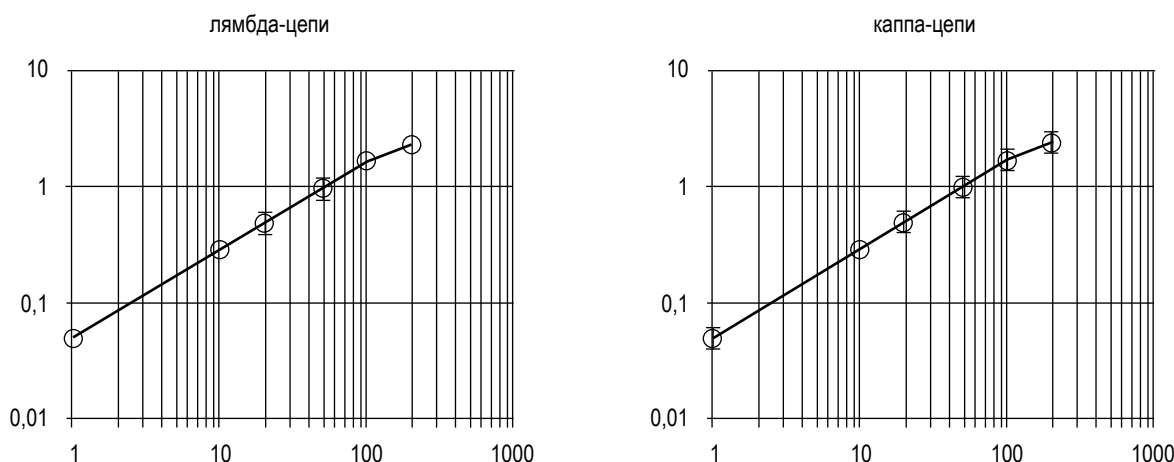


Рисунок 1. Калибровочные графики для определения концентраций СЛЦ каппа- (А) или лямбда-типа (Б)

Примечание. По оси абсцисс – концентрации антигенов (нг/мл), по оси ординат – оптическая плотность (условные единицы). На графиках указаны средние значения и стандартные отклонения.

дой фазе, оно было использовано для разработки иммунометрической системы определения концентраций СЛЦ лямбда-типа.

Определение диапазона линейных значений оптической плотности показало, что такой интервал для СЛЦ каппа- и лямбда-типа находится в пределах от 1 до 100 нг/мл (рис.2). Отклонения от линейного характера зависимости наблюдали при увеличении концентраций СЛЦ до 200 нг/мл.

Приведенные калибровочные графики были использованы для определения концентраций СЛЦ в сыворотке крови и в моче здоровых доноров и пациентов с миеломной болезнью (табл. 2). Выявленные у доноров концентрации свободных каппа- и лямбда-цепей находились в пределах одного числового диапазона, что позволило вычислять коэффициенты каппа/лямбда, которые оказались близки к ожидаемым величинам. При

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИИ СВОБОДНЫХ ЛЕГКИХ ЦЕПЕЙ КАППА- И ЛЯМБДА-ТИПОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И В МОЧЕ ДОНОРОВ И ПАЦИЕНТОВ С МНОЖЕСТВЕННОЙ МИЕЛОМОЙ

Исследуемый материал	Количество образцов	каппа-цепи (мкг/мл)	лямбда-цепи (мкг/мл)	Соотношение каппа/лямбда
Здоровые доноры				
Сыворотка крови	30	6,7±2,1 (3,4-11,35)	4,7±2,0 (1,65-8,65)	1,56±0,5 (0,87-2,8)
Моча	23	4,2±3,8 (0,11-13,7)	1,6±1,0 (0,08-3,69)	2,2±1,7 (0,64-6,5)
Множественная миелома с моноклональным Ig-каппа				
Сыворотка крови	16	124,2 (3,7-365)	3,5 (0,5-8,2)	39 (2,7-256)
Моча	16	414 (0,38-1182)	3,39 (0,15-7,2)	423 (2,5-1212)
Множественная миелома с моноклональным Ig-лямбда				
Сыворотка крови	18	8,7 (1,7-17)	79 (10,5-300)	0,17 (0,0016-1,6)
Моча	18	5,4 (0,06-17)	217,3 (0,006-560)	0,5 (0,01-8,7)

Примечание. Указаны средние значения с доверительными интервалами, в скобках – минимальные и максимальные значения концентраций.

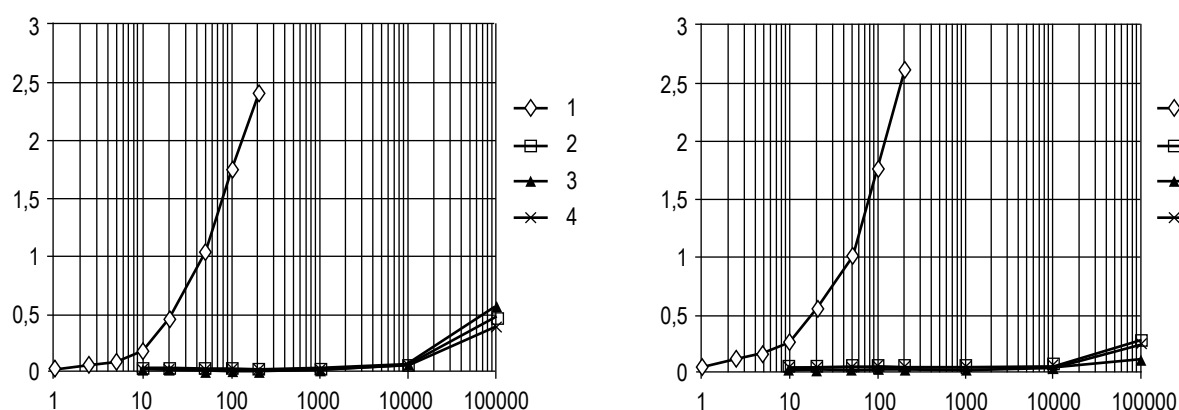


Рисунок 2. Выявление СЛЦ каппа- (А) или лямбда- (Б) типа в препаратах ББД (1), аффинно очищенного IgG человека (2) и в препаратах IgG для внутривенного введения: Пентаглобине (3) и Иммуновенине (4)

Примечание. По оси абсцисс – концентрация препаратов (нг/мл), по оси ординат – оптическая плотность (условные единицы).

исследовании образцов сыворотки и мочи пациентов с миеломной болезнью было установлено, что выявленные типы моноклональных СЛЦ соответствовали типам обнаруженных парапротеинов, а их концентрации в сыворотке и в моче варьировали в широких пределах. Соответственно были изменены и коэффициенты каппа/лямбда: при наличии моноклонального Ig лямбда-типа их значения были меньше единицы, при наличии Ig каппа-типа увеличивались в десятки и сотни раз.

Подтверждение специфичности разработанного метода было получено путем сравнения зависимостей величин оптической плот-

ности от концентраций выявляемых антигенов. Если исследуемые пробы содержали ББД каппа- или лямбда-типа, величина сигнала начинала расти при концентрациях от 1 до 10 нг/мл. Если пробы содержали IgG, аффинно очищенный на протеин G-сепарозе, или препараты IgG для внутривенного введения (Пентаглобин или Иммуновенин), рост сигнала регистрировали при концентрациях, в 10 000 раз превышающих указанный интервал величин (рис. 2).

Определенные в ходе экспериментов метрологические характеристики метода приведены в таблице 3.

ТАБЛИЦА 3. ОСНОВНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИММУНОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ КОНЦЕНТРАЦИЙ СЛЦ В СЫВОРОТКЕ И МОЧЕ

Показатели	При определении концентраций	
	каппа-цепей	лямбда-цепей
Порог детекции (нг/мл)	5	3
Коэффициенты вариации при выявлении СЛЦ в сыворотке (%)	6,8	7,8
Коэффициенты вариации при выявлении СЛЦ в моче	10,8	7,7
Диапазон линейности (нг/мл)	1-100	1-100
Тест на открытие в сыворотке (%)	110	100
Тест на открытие в моче (%)	105	105

Обсуждение

Криптические эпитопы СЛЦ известны уже более 35 лет [20], но до сих пор остаются недостаточно изученными. Не определено их число, взаимное расположение на молекулах каппа- и лямбда-цепей, их способность реагировать со специфическими антителами. МКАТ, распознающие криптические эпитопы СЛЦ, описаны в ряде публикаций [12, 15, 20, 22], но детально также не изучены. Новое МКАТ (1С8), полученное в ходе настоящей работы, распознает эпитоп лямбда-цепей, который присутствует на антигене в циркулирующей крови здоровых доноров и пациентов с миеломной болезнью, не разрушается и не маскируется в процессе почечной фильтрации. Как уже было сказано, попытки разработать иммунометрический метод детекции СЛЦ на основе МКАТ долгое время не давали желаемых результатов.

Для определения концентрации СЛЦ в клинических лабораториях в настоящее время чаще всего используют коммерчески доступные наборы реагентов FREELITE™ Каппа kit и FREELITE™ Lambda kit (The Binding Site Ltd., Великобритания). Анализ основан на нефелометрическом или турбидиметрическом выявлении агглютинации латексных частиц, сенсibilизированных аффинно очищенными поликлональными антителами против каппа- или лямбда-цепей [9, 18, 19]. Для его выполнения требуются дорогостоящие реагенты и аналитическое оборудование. Порог детекции СЛЦ в методе FREELITE составляет 1-3 мкг/мл. Рекомендуемое производителем начальное разведение образца составляет 1:10, что не позволяет выявлять СЛЦ в ряде проб, например, в спинномозговой жидкости, без предварительного концентрирования. Сомнения в корректности определения СЛЦ с помощью метода, основанного на поликлональных антителах, высказаны во многих публикациях [11, 29, 30], а также в дискуссии на страницах авторитетного научного журнала [19]. Сомнения касаются вариабельности результатов при использовании

отдельных серий реагентов, риска искажения данных при высоких концентрациях антигена в пробе и сохранения линейности в пределах динамического диапазона.

Описанный в настоящей работе метод определения уровней СЛЦ обладает высокой чувствительностью, т.к. позволяет выявлять в сыворотке и в моче нанограммовые концентрации СЛЦ, что на три порядка превышает возможности метода Freelite.

Одним из факторов, осложняющих сравнение результатов измерения уровней СЛЦ в сыворотке крови и других биологических жидкостях у здоровых лиц и при различных заболеваниях, является отсутствие международно признанных референс-образцов, которые могли бы служить для сопоставления данных, полученных в разных лабораториях.

В качестве калибраторов в настоящей работе, так же как в ряде других, использованы смеси из нескольких ББД. В других исследованиях используют поликлональные СЛЦ, полученные в результате фрагментирования интактных Ig и последующего выделения каппа- и лямбда-цепей. Предложено также использовать пул СЛЦ, выделенных из мочи здоровых волонтеров [23]. Однако использование поликлональных СЛЦ также не может обеспечить точность определения концентрации СЛЦ при гаммапатиях, так как каждый ББД уникален по структуре и способности взаимодействовать с антителами.

Применение МКАТ для выявления СЛЦ может обеспечивать высокий уровень воспроизводимости, однако реагенты с необходимой совокупностью свойств до сих пор не были разработаны. Так, в системе, описанной в 2008 году [12], калибровочные графики для определения концентраций каппа- и лямбда- цепей принципиально различны: первый имеет форму кривой насыщения, второй – сигмоидную.

Описанный в настоящей работе метод обладает высокой специфичностью, т.к. позволяет выявлять СЛЦ в присутствии 10 000-кратного избыт-

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ СЛЦ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И В МОЧЕ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ (по данным литературы и настоящего исследования)

Метод определения	Концентрация СЛЦ				Публикации
	в сыворотке крови		в моче		
	каппа-типа	лямбда-типа	каппа-типа	лямбда-типа	
ИФА	10 (1,6-15,2) ^a	3 (0,4-4,2) ^a	–	–	[24]
ИФА	16,6±6,1 ^a	33,8±14,8 ^a	2,96±1,84 ^a	1,07±0,69 ^a	[5]
Нефелометрия	8,4±2,66 ^a	14,5±4,4 ^a	5,5±4,95 ^a	3,17±3,3 ^a	[8]
Нефелометрия	6,3-9,1 ^c	12,4-15,1 ^c	–	–	[18]
ИФА	25,7±10,5 ^a	4,34±2,0 ^a	1,25±1,76 ^b	0,51±0,69 ^b	[22]
ИФА	7,9±2,8 ^a	58,5±26,0 ^a	–	–	[12]
ИФА	6,7±2,1 ^a	4,7±1,96 ^a	4,2±3,8 ^a	1,6±1,0 ^a	наст. работа

Примечание. ^a – мкг/мл, ^b – мг/г креатинина, ^c – 95% доверительный интервал, «—» – отсутствие данных.

ка молекул целостных Ig. Порог детекции СЛЦ каппа-типа – 5 нг/мл, лямбда-цепей – 3 нг/мл. Следовательно, начальные разведения образцов сыворотки и мочи могут составлять 1/100 и 1/30 соответственно. Существенное достоинство разработанного метода состоит в том, что калибровочные графики для определения концентраций каппа- и лямбда-цепей имеют форму линейных зависимостей с одинаковым наклоном и охватывают практически совпадающие динамические диапазоны (от 1 до 100 нг/мл).

В сыворотке и моче здоровых доноров с помощью описанного метода выявляются сопоставимые концентрации СЛЦ каппа- и лямбда-типов (табл. 3), что позволяет определять соотношение каппа/лямбда и оценивать отклонения от нормальных значений у пациентов с гаммапатиями. Рекомендации международной рабочей группы предлагают рассматривать коэффициент каппа/лямбда как один из основных критериев при установлении диагноза миеломной болезни и начала терапии [28].

Полученные в настоящей работе значения концентраций СЛЦ и их соотношения у здоровых лиц носят ориентировочный характер. Они демонстрируют возможность получения с помощью описанной системы результатов, которые согласуются с данными ряда публикаций

(табл. 4). В то же время очевидно, что необходимы испытания метода с привлечением более обширных групп здоровых доноров и пациентов.

Опыт применения описанного метода при обследовании пациентов с неврологическими нарушениями показал, что он позволяет выявлять СЛЦ в сыворотке крови и в спинномозговой жидкости без предварительного концентрирования образцов и с высокой степенью достоверности идентифицировать индивидов, у которых повышен риск развития рассеянного склероза в течение последующих двух лет [25].

Как следует из данных, приведенных на рисунке 2, при исследовании препаратов IgG для внутривенного введения при концентрациях IgG, превышающих 10 мкг/мл, наблюдается рост оптической плотности, который может быть связан с присутствием примесей СЛЦ, образующихся в процессе изготовления или хранения препаратов. Поскольку известно, что СЛЦ способны взаимодействовать с мембранами тучных клеток [16] и индуцировать проявления гиперчувствительности [26], наличие их в препаратах лечебного назначения представляется нежелательным. В связи с этим логично предположить, что описанный метод может оказаться полезным при контроле качества препаратов IgG для внутривенного введения.

Список литературы / References

1. Грязева И.В., Климович В.Б., Пашкова С.Ф. Моноклональные антитела к легким цепям иммуноглобулинов человека и их применение в иммуноанализе // Иммунология, 1994. № 3. С. 31-37. [Gryazeva I.V., Klimovich V.B., Pashkova S.F. Application of monoclonal antibodies to light chains of human immunoglobulins in immunoassays. *Immunologiya = Immunologia*, 1994, no. 3, pp. 31-37. (In Russ.)]
2. Климович В.Б., Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю., Грязева И.В., Шмидт Е.Н., Котова Т.С. Получение и иммунохимическая характеристика моноклональных антител против IgM человека // Биотехнология, 1997. № 4. С. 40-46. [Klimovich V.B., Samoylovich M.P., Krutetskaya I.Yu., Gryazeva I.V., Schmidt E.N., Kotova T.S. Development and characterization of monoclonal antibodies against human IgM. *Biotechnologiya = Biotechnology*, 1997, no. 4, pp. 40-46. (In Russ.)]
3. Климович В.Б., Самойлович М.П., Грязева И.В., Крутецкая И.Ю. Моноклональные антитела против иммуноглобулинов в диагностике заболеваний человека // Медицинский Академический Журнал. 2008.

T. 8, № 3. С. 84-95. [Klimovich V.B., Samoilovich M.P., Griaeva I.V., Krutetskaya I.Yu. Monoclonal antibodies against immunoglobulins in diagnostics of human diseases. *Meditsinskiy akademicheskii zhurnal = Medical Academic Journal*, 2008, Vol. 8, no. 3, pp. 84-95. (In Russ.)]

4. Самойлович М.П., Крутецкая И.Ю., Климович В.Б., Шмидт Е.Н., Пашкова С.Ф., Котова Т.С. Моноклональные антитела против подклассов IgG человека. Получение и определение специфичности // Иммунология, 1998. № 3. С. 27-30. [Samoylovich M.P., Krutetskaya I.Yu., Klimovich V.B., Schmidt E.N., Pashkova S.F., Kotova T.S. Monoclonal antibodies to human IgG subclasses. Development and specificity determination. *Immunologiya = Immunology*, 1998, no. 3, pp. 27-30. (In Russ.)]

5. Abe M., Goto T., Kosaka M., Wolfenbarger D., Weiss D.T., Solomon A. Differences in kappa to lambda (kappa:lambda) ratios of serum and urinary free light chains. *Clin. Exp. Immunol.*, 1998, Vol. 111, no. 2, pp. 457-462.

6. Abe M., Goto T., Wolfenbarger D., Weiss D.T., Solomon A. Novel immunization protocol and ELISA screening methods used to obtain and characterize monoclonal antibodies specific for human light chain variable-region subgroups. *Hybridoma*, 1993, Vol. 12, no. 4, pp. 475-483.

7. Boscato L.M., Egan G.M., Stuart M.C. Specificity of two-site immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 1989, Vol. 117, no. 2, pp. 221-229.

8. Bradwell A.R., Carr-Smith H.D., Mead G.P., Tang L.X., Showell P.J., Drayson M.T., Drew R. Highly sensitive automated immunoassay for immunoglobulin free light chains in serum and urine. *Clin. Chem.*, 2001, Vol. 47, pp. 673-680.

9. Brebner J.A., Stockley R.A. Polyclonal free light chains: a biomarker of inflammatory disease or treatment target? *F1000 Med. Rep.*, 2013, Vol. 5, 4.

10. Bridoux F., Leung N., Hutchison C.A., Touchard G., Sethi S., Ferman J.P., Picken M.M., Herrera G.A., Kastiris E., Merlini G., Roussel M., Fervenza F.C., Dispenzieri A., Kyle R.A., Nasr S.H. International Kidney and Monoclonal Gammopathy Research Group. Diagnosis of monoclonal gammopathy of renal significance. *Kidney Int.*, 2015, Vol. 87, no. 4, pp. 698-711.

11. Daval S., Tridon A., Mazon N., Ristori J.M., Evrard B. Risk of antigen excess in serum free light chain measurements [letter]. *Clin. Chem.*, 2007, Vol. 53, no. 11, pp. 1985-1986.

12. Davern S., Tang L.X., Williams T.K., Macy S.D., Wall J.S., Weiss D.T., Solomon A. Immunodiagnostic capabilities of anti-free immunoglobulin light chain monoclonal antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2008, Vol. 130, no. 5, pp. 702-711.

13. Dimopoulos M., Kyle R., Ferman J.P., Rajkumar S.V., San Miguel J., Chanan-Khan A., Ludwig H., Joshua D., Mehta J., Gertz M., Avet-Loiseau H., Beksaç M., Anderson K.C., Moreau P., Singhal S., Goldschmidt H., Boccadoro M., Kumar S., Giral S., Munshi N.C., Jagannath S. International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. Consensus recommendations for standard investigative workup: report of the International Myeloma Workshop Consensus Panel 3. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 18, pp. 4701-4705.

14. Hales C.N., Woodhead J.S. Labelled antibodies and their use in the immunometric assay. *Meth. Enzymol.*, 1980, Vol. 70A, pp. 334-355.

15. Hutchison C.A., Basnayake K., Cockwell P. Serum free light chain assessment in monoclonal gammopathy and kidney disease. *Nat. Rev. Nephrol.*, 2009, Vol. 5, no. 11, pp. 621-618.

16. Hutchinson A.T., Jones D.R., Raison R.L. The ability to interact with cell membranes suggests possible biological roles for free light chain. *Immunol. Lett.*, 2012, Vol. 142, no. 1-2, pp. 75-77.

17. Kaplan B., Aizenbud B.M., Golderman S., Yaskariyev R., Sela B.A. Free light chain monomers in the diagnosis of multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.*, 2010, Vol. 229, no. 1-2, pp. 263-271.

18. Katzmann J.A., Clark R.J., Abraham R.S., Bryant S., Lymp J.F., Bradwell A.R., Kyle R.A. Serum reference intervals and diagnostic ranges for free kappa and free lambda immunoglobulin light chains: relative sensitivity for detection of monoclonal light chains. *Clin. Chem.*, 2002, Vol. 48, no. 9, pp. 1437-1444.

19. Legg A., Hobbs J.A.R., Mead G.P., Bradwell A.R. Monoclonal vs Polyclonal Free Light Chain Assays. *Am. J. Clin. Pathol.*, 2009, Vol. 131, no. 6, pp. 897-903.

20. Ling N.R., Lowe J., Hardie D., Evans S., Jefferis R. Detection of free kappa chains in human serum and urine using pairs of monoclonal antibodies reacting with C kappa epitopes not available on whole immunoglobulins. *Clin. Exp. Immunol.*, 1983, Vol. 52, no. 1, pp. 234-240.

21. Nakano T., Matsui M., Inoue I., Awata T., Katayama S., Murakoshi T. Free immunoglobulin light chain: its biology and implications in diseases. *Clin. Chim. Acta*, 2011, Vol. 412, no. 11-12, pp. 843-849.

22. Nakano T., Nagata A. ELISAs for free human immunoglobulin light chains in serum: improvement of assay specificity by using two specific antibodies in a sandwich detection method. *J. Immunol. Methods*, 2004, Vol. 293, no. 1-2, pp. 183-189.

23. Nakano T., Miyazaki S., Shinoda Y., Inoue I., Katayama S., Komoda T., Nagata A. Proposed reference material for human free immunoglobulin light chain measurement. *J. Immunoassay Immunochem.*, 2006, Vol. 27, no. 2, pp. 129-137.

24. Nelson M., Brown R.D., Gibson J., Joshua D.E. Measurement of free kappa and lambda chains in serum and the significance of their ratio in patients with multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, 1992, Vol. 81, no. 2, pp. 223-230.

25. Makshakov G., Nazarov V., Kochetova O., Surkova E., Lapin S., Evdoshenko E. Diagnostic and Prognostic Value of the Cerebrospinal Fluid Concentration of Immunoglobulin Free Light Chains in Clinically Isolated Syndrome with Conversion to Multiple Sclerosis. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 11, e0143375.

26. Powe D.G., Groot-Kormelink T., Sisson M., Blokhuis B.J., Kramer M.F., Jones N.S., Redegeld F.A. Evidence for the involvement of free light chain immunoglobulins in allergic and nonallergic rhinitis. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2010, Vol. 125, no. 1, pp. 139-145.
27. Pratt G. The evolving use of serum free light chain assays in haematology. *Br. J. Haematol.*, 2008, Vol. 141, no. 4, pp. 413-422.
28. Rajkumar S.V., Dimopoulos M.A., Palumbo A., Blade J., Merlini G., Mateos M.V., Kumar S., Hillengass J., Kastritis E., Richardson P., Landgren O., Paiva B., Dispenzieri A., Weiss B., LeLeu X., Zweegman S., Lonial S., Rosinol L., Zamagni E., Jagannath S., Sezer O., Kristinsson S.Y., Caers J., Usmani S.Z., Lahuerta J.J., Johnsen H.E., Beksac M., Cavo M., Goldschmidt H., Terpos E., Kyle R.A., Anderson K.C., Durie B.G., Miguel J.F. International Myeloma Working Group updated criteria for the diagnosis of multiple myeloma. *Lancet Oncol.*, 2014, Vol. 15, no. 12, pp. 538-548.
29. Tate J.R., Gill D., Cobcroft R., Hickman P.E. Practical considerations for the measurement of free light chains in serum. *Clin. Chem.*, 2003, Vol. 49, no. 8, pp. 1957-1958.
30. Tate J.R., Mollee M., Dimeski G., Carter A.C., Gill D. Analytical performance of serum free light-chain assay during monitoring of patients with monoclonal light-chain diseases. *Clin. Chim. Acta*, 2007, Vol. 376, no. 1-2, pp. 30-36.

Авторы:

Самойлович М.П. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории гибридомной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий»; Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Грязева И.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории гибридомной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

Мазинг А.В. — к.м.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Лапин С.В. — к.м.н., заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Климович В.Б. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией гибридомной технологии ФГБУ «Российский научный центр радиологии и хирургических технологий», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Samoylovich M.P., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Hybridoma Technology Laboratory, Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Griazeva I.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Hybridoma Technology Laboratory, Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Mazing A.V., PhD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Diagnostics of Autoimmune Diseases, First I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory of Diagnostics of Autoimmune Diseases, First I.P. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Klimovich V.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Hybridoma Technology Laboratory, Russian Research Center for Radiology and Surgical Technologies, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 23.05.2016
Принята к печати 14.06.2016

Received 23.05.2016
Accepted 14.06.2016

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.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

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) благодарность.

- **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-1β 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-1β 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 «Медицинская иммунология» 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 специальных сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержанию в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx., rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

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

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Арутюнян С.С.	379	Курочкина Ю.Д.	347	Ракитина Е.Л.	365
Балацкая Н.В.	357	Курчаева З.В.	357	Савченко А.А.	379
Баторов Е.В.	347	Лапин С.В.	385	Самойлович М.П.	385
Борисов А.Г.	379	Леплина О.Ю.	309, 347	Саркисян Н.С.	365
Гаврилова М.В.	331	Лим В.В.	373	Сидорова Е.В.	331
Грязева И.В.	385	Логвиненко О.В.	365	Сизиков А.Э.	347
Еремеева А.В.	373	Мазинг А.В.	385	Снегирева Н.А.	331
Зайцева О.В.	357	Минеев В.Н.	373	Сорокина Л.Н.	373
Казыгашева Е.В.	317	Мошев А.В.	379	Старостина Н.М.	309
Камышный А.М.	339	Нёма М.А.	373	Тихонова М.А.	347
Каспаров Э.В.	379	Нероев В.В.	357	Трофимов В.И.	373
Климович В.Б.	385	Олейник Е.А.	309	Тыринова Т.В.	347
Костюченко М.В.	365	Останин А.А.	309, 347	Черных Е.Р.	309, 347
Кудрявцев И.В.	379	Пономаренко Д.Г.	365	Ширинский В.С.	317
Куличенко А.Н.	365	Путилин Д.А.	339	Ширинский И.В.	317

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адаптивный иммунный ответ	309	панкреатические лимфатические узлы	339
алло-СКЛ.....	347	патогенез.....	357
антиген-специфический Т-клеточный ответ...	309	пролиферативная диабетическая	
антигены	331	ретинопатия.....	357
антителопродуценты.....	331	противобактериальный иммунитет.....	379
белки Бенс-Джонса.....	386	сахарный диабет 2 типа	317
бронхиальная астма.....	373	свободные легкие цепи	386
бруцеллез	365	стрептозотоцин-индуцированный сахарный	
В1-лимфоциты	331	диабет.....	339
вирусные антигены	309	субпопуляционный состав.....	379
вирусный гепатит С.....	309	сыворотка крови.....	386
витреоретинальная хирургия	357	тест активации базофилов	365
В-лимфоциты	379	транскрипционные факторы	373
гаммапатии	386	хронический аднексит	379
генетика	317	хронический эндометрит	379
дексаметазон	347	цитокины	347
дендритные клетки.....	347	экспрессия генов.....	339
диабет-ассоциированный остеоартрит	317	AMPK1 α	339
иммунопатогенез.....	317	Breg	331
иммуносупрессия	365	CD4 ⁺ Т-клетки	309
иммуноферментный анализ	386	CD8 ⁺ Т-клетки	309
индукция иммунного ответа <i>in vitro</i>	331	FoxP3.....	373
интерферон- α	347	Glut1.....	339
коморбидность	317	Ig	386
моноклональные антитела.....	386	IL-10.....	331
моноклеары	373	<i>in vitro</i> аллегодиагностика	365
моча.....	386	mTOR.....	339
низкоаффинный рецептор IgE	379	VEGF-A	357
остеоартрит.....	317		