

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

сентябрь-октябрь

2016, том 18

№ 5

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдлин Ирина Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии 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. 12,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1228

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

September-October

2016, volume 18

No. 5

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, 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 12,5. Circulation 2000 copies. (1st edition – 1000 copies.)

Produced at the IPK Beresta Printing House.

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

Phone: (812) 388-90-00

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

Since 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

Обзоры

Анохин Ю.Н., Абакушина Е.В.

ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПОСЛЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ405

Оригинальные статьи

Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FlCVP6VP8417

Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Блинова Д.Д., Желтова О.И., Олейник Е.А., Тыринова Т.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ425

Евстратова В.С., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б., Ханферьян Р.А.

ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ ХЕМОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ И ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ: РОЛЬ ГИСТАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ H₃/H₄-ТИПА437

Емелина Ю.Н., Зурочка А.В.

СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В НАЗАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ У ДЕТЕЙ С СОЧЕТАННЫМИ ФОРМАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИИ ДО И ПОСЛЕ 3 КУРСОВ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ АЛЛЕРГЕНСПЕЦИФИЧЕСКОЙ ИММУНОТЕРАПИИ.....443

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

ЭКСПРЕССИЯ НЕГАТИВНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ451

Архипов С.А., Михайлова Е.С., Кунц Т.А., Карпухина К.В., Могильная Е.Д., Соловьев К.А., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И.

ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИЙ РЕЗЕРВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ И ИНВАЗИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ459

Краткие сообщения

Свитич О.А., Ганковская Л.В., Беренштейн А.В., Перепанова Т.С., Волкова Е.М.

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА (TLR2, TLR4 И NBD1) В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ УРЕТРЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БАКТЕРИАЛЬНОМ ЦИСТИТЕ.....469

Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзитовецкий Д.Э., Гвоздев И.И.

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ АБДОМИНАЛЬНОГО СЕПСИСА У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ475

Зорина В.Н., Промзелева Н.В., Зорин Н.А., Рябичева Т.Г., Зорина Р.М.

ПРОДУКЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ483

Зотина Е.Н., Загоскина Т.П., Шардаков В.И., Йоведий А.В., Зайцева Г.А.

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ489

Правила для авторов495

Авторский указатель498

Предметный указатель498

CONTENTS

Reviews

Anokhin Yu.N., Abakushina E.V.

TUMOR-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY	405
---	-----

Original articles

Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A.S.

PROTECTIVE ACTIVITY STUDY OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INFECTION BASED ON RECOMBINANT PROTEIN FliCVP6VP8	417
--	-----

Leplina O.Yu., Starostina N.M., Blinova D.D., Zheltova O.I., Oleinik E.A., Tyrinova T.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

RESULTS OF A PILOT CLINICAL TRIAL OF DENDRITIC-CELL BASED VACCINES FOR TREATMENT OF RECURRENT HERPESVIRUS INFECTION	425
---	-----

Evstratova V.S., Riger N.A., Nikityuk D.B., Khanferyan R.A.

CHEMOKINE SECRETION PATTERNS IN MONONUCLEAR AND DENDRITIC CELLS: ROLE OF HISTAMINE TYPE H ₃ /H ₄ RECEPTORS	437
--	-----

Emelina Yu.N., Zurochka A.V.

CYTOKINE CONTENTS IN NASAL SECRETIONS OF CHILDREN WITH COMBINED FORMS OF RESPIRATORY POLLEN ALLERGY BEFORE AND AFTER THREE COURSES OF SUBLINGUAL ALLERGEN-SPECIFIC IMMUNOTHERAPY	443
--	-----

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

EXPRESSION OF NEGATIVE TRANSCRIPTION REGULATORS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA	451
--	-----

Arkhipov S.A., Mikhailova E.S., Kunts T.A., Karpukhina K.V., Mogilnaya E.D., Solovyev K.A., Varaksin N.A., Autenshlyus A.I.

CYTOKINE-PRODUCING RESERVE OF IMMUNOCOMPETENT CELLS FROM BLOOD AND INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER TISSUES: ITS CORRELATION WITH HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS OF MALIGNANT NEOPLASIA	459
--	-----

Short communications

Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Berenshtein A.V., Perepanova T.S., Volkova E.M.

STUDIES OF INNATE IMMUNITY PARAMETERS (TLR2, TLR4 AND HBD1) OF URETHRAL MUCOUS EPITHELIUM IN CHRONIC BACTERIAL CYSTITIS	469
---	-----

Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetsky D.E., Gvozdev I.I.

CYTOKINE REGULATION OF RESPIRATORY BURST IN BLOOD NEUTROPHILS FOR PREDICTION OF ABDOMINAL SEPSIS IN PATIENTS WITH EXTENDED PURULENT PERITONITIS	475
---	-----

Zorina V.N., Promzeleva N.V., Zorin N.A., Ryabicheva T.G., Zorina R.M.

PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND ALPHA-2-MACROGLOBULIN BY PERIPHERAL BLOOD CELLS IN THE PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER	483
--	-----

Zotina E.N., Zagoskina T.P., Shardakov V.I., Yovdy A.V., Zaitseva G.A.

PROGNOSTIC VALUE OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA	489
---	-----

Instructions to Authors	495
-------------------------------	-----

Author index	498
--------------------	-----

Subject index	498
---------------------	-----

ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ИММУННЫЙ ОТВЕТ ПОСЛЕ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Анохин Ю.Н.¹, Абакушина Е.В.^{1,2}

¹ ИАТЭ Национальный исследовательский ядерный университет «Московский инженерно-физический институт», г. Обнинск, Россия

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

Резюме. Рост заболеваемости злокачественными новообразованиями диктует поиск новых способов терапии. Фотодинамическая терапия (ФДТ) является эффективным средством для лечения рака. Она основана на введении фотосенсибилизатора, с последующим облучением опухоли видимым светом. Доклинические исследования показали, что локальная фотодинамическая терапия повышает системный противоопухолевый иммунитет. Кроме того, давно известно, что долгосрочная эффективность ФДТ зависит от адаптивного иммунитета. Понятно, что иммунная система играет фундаментальную роль в этом процессе. Одним интересным аспектом ФДТ является ее способность стимулировать системный иммунный ответ против локально обработанной опухоли. Как было показано, ФДТ эффективно стимулирует как врожденный, так и адаптивный иммунитет, вызывая высвобождение медиаторов при развитии острой воспалительной реакции, что приводит к инфильтрации обработанного участка большим количеством нейтрофилов, дендритных клеток и других участников процесса. Эффективность ФДТ частично зависит от процесса индукции противоопухолевого иммунного ответа, который зависит от цитотоксических Т-лимфоцитов и клеток естественных киллеров (NK). Посредством набора рецепторов натуральные киллеры распознают на поверхности клеток молекулы, экспрессия которых указывает на вирусную инфекцию, опухолеобразование или повреждения, вызванные клеточным стрессом. NK-клетки участвуют в различных биологических процессах в организме; они играют важную роль в иммунном надзоре и могут быть использованы для лечения рака. Было продемонстрировано, что после ФДТ опухолевые клетки обладают повышенной чувствительностью к лизису, опосредованному NK-клетками. В этом обзоре мы сделали акцент на потенциальную взаимосвязь между ФДТ и противоопухолевым иммунным ответом.

Ключевые слова: фотодинамическая терапия, онкологические заболевания, противоопухолевый иммунный ответ, NK-клетки, молекулы MICA, NKG2D, активация лимфоцитов

Адрес для переписки:

Абакушина Елена Вячеславовна
Медицинский радиологический научный центр
им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский радиологический
центр» Министерства здравоохранения РФ
249036, Россия, г. Обнинск, ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (903) 814-33-82.
Факс: 8 (495) 956-14-40.
E-mail: abakushina@mail.ru

Address for correspondence:

Abakushina Elena V.
A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of the
National Medical Research Radiological Centre
249036, Russian Federation, Obninsk, Koroleva, str., 4.
Phone: 7 (903) 814-33-82.
Fax: 7 (495) 956-14-40.
E-mail: abakushina@mail.ru

Образец цитирования:

Ю.Н. Анохин, Е.В. Абакушина «Опухолеспецифический
иммунный ответ после фотодинамической терапии»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 405–416.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-405-416

© Анохин Ю.Н., Абакушина Е.В., 2016

For citation:

Yu. N. Anokhin, E. V. Abakushina "Tumor-specific immune
response after photodynamic therapy", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 5,
pp. 405–416. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-405-416

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-405-416>

TUMOR-SPECIFIC IMMUNE RESPONSE AFTER PHOTODYNAMIC THERAPY

Anokhin Yu.N.^a, Abakushina E.V.^{a,b}

^a National Research Nuclear University "Moscow Engineering Physics Institute", Obninsk, Russian Federation

^b A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russian Federation

Abstract. Increased incidence of malignancies requires a search for new therapeutic approaches. E.g., photodynamic therapy (PDT) is an effective anti-cancer treatment that involves administration of a photosensitizing dye followed by visible light irradiation of the tumor. Pre-clinical studies have shown that local photodynamic therapy enhances systemic antitumor immunity. Moreover, it is well known that the long-term effects of PDT depend on functioning of intact adaptive immune response. In this context, the immune system plays a fundamental role. Interestingly, the PDT action is associated with stimulation of systemic immune response against a locally treated tumor. In fact, PDT has been shown to effectively stimulate both innate and adaptive immune systems of the host, by triggering the release of various pro-inflammatory and acute-phase response mediators thus leading to massive infiltration of the treated site with neutrophils, dendritic cells and other inflammatory cells. PDT efficacy depends, in part, on induction of tumor-specific immune response which is dependent on cytotoxic T lymphocytes and natural killer (NK) cells. The set of specific receptors enables NK cells to recognize surface molecules on the target cells. Expression of the latter molecules is indicative of viral infection, tumor formation, or cell stress (e.g., DNA damage). The NK cells are also involved into various biological processes in the organism, playing a critical role in immune surveillance, thus representing a potential tool for cancer therapy. It was shown that the tumor cells have increased sensitivity to NK cell-mediated lytic action following PDT. In this review, we further discuss potential relationships between PDT and antitumor immune response.

Keywords: photodynamic therapy, cancer, antitumor immune response, natural killer cells, MICA, NKG2D molecules, lymphocyte activation

Введение

Ежегодно наблюдается увеличение уровня заболеваемости злокачественными новообразованиями, а также повышается смертность от них [8]. В то же время наибольшее число пациентов имеет трудоспособный и социально активный возраст. Традиционные методы лечения злокачественных новообразований, включающие оперативное вмешательство, химиотерапию и лучевую терапию, не всегда приводят к положительному результату лечения. Все эти обстоятельства придают важный социальный оттенок работам, посвященным усовершенствованию методов лечения опухолей. Применение стандартных подходов лечения онкологических заболеваний, при малой их эффективности, часто сопровождается развитием нежелательных реакций и осложнений, приводящих, в том числе, к иммунодефицитным состояниям. В ряде исследований последних лет показано, что опухоль способна привлекать клетки иммунной системы и создавать в своем микроокружении иммуносупрессивный фон, что препятствует формированию адекватного противоопухолевого иммунного ответа. Таким образом, усовершенствование мето-

дов лечения злокачественных новообразований, увеличение их эффективности и безопасности является основной медицинской проблемой в лечении такой категории больных. Фотодинамическую терапию (ФДТ) можно рассматривать как дополнительный перспективный метод в лечении рака, который активно внедряется в клиническую практику.

ФДТ в лечении онкологических заболеваний

До начала 80-х годов прошлого столетия существовало убеждение, что основным противопоказанием к использованию лазерной терапии являются онкологические заболевания, но после появления сведений об успешном применении облучения низкоинтенсивным лазером при лечении больного раком гортани, лазерная терапия получила стремительное развитие в лечении рака и в последние десятилетия стала входить в программы комплексной лучевой терапии онкологических больных как один из основных видов лечения. Оценка влияния лучевой терапии и лучевых реакций при развитии рака выявила, что ряд иммунологических показателей нормализуется. Существует практика применения внутривенного облучения крови пациентов, больных

раком гортани, совместно с лучевой терапией. При этом снижается частота развития лучевых реакций и происходит улучшение иммунологических показателей [28].

В настоящее время ФДТ — эффективный органосохраняющий метод лечения различных злокачественных новообразований, особенно при неблагоприятной локализации процесса и в тех случаях, когда возможности традиционных методов лечения ограничены. Установлено, что полная резорбция опухоли может быть достигнута при однократном или поэтапном воздействии без развития побочных эффектов, с максимальным сохранением жизнеспособности окружающих здоровых тканей [12]. Показана высокая эффективность ФДТ в лечении как доброкачественных новообразований, так и злокачественных опухолей кожи [9]. Высокая результативность отмечена также при ФДТ рака шейки матки, полости рта, предстательной железы, бронхов и других локализаций [14, 34]. ФДТ была одобрена также для лечения раннего и позднего эндобронхиального немелкоклеточного рака легких, для паллиативного лечения рака пищевода у пациентов, которым операция и радиотерапия противопоказаны. Кроме того, различные варианты ФДТ используются при лечении новообразований желудочно-кишечного тракта, таких как рак желудка, рак двенадцатиперстной кишки, желчного пузыря, поджелудочной железы и колоректального рака [35, 52]. Показано, что ФДТ расширяет возможности оказания паллиативной медицинской помощи больным с часто рецидивирующим течением заболевания, так как обладает преимуществом повторного и многократного проведения облучения без рисков развития местных и системных осложнений.

Имеются сведения об эффективном лечении некоторых видов опухолей сочетанием ФДТ с лучевой терапией, химиотерапией и/или иммунотерапией [7, 22, 29, 36, 50]. Проведение ФДТ в комплексе с иммунотерапией вызывало формирование противоопухолевой резистентности к повторной вакцинации опухолевыми клетками у животных, увеличению времени их жизни и уменьшению числа метастазов [21]. Было доказано, что мишенью для ФДТ опухолей с использованием зонда на красителе, меченном фталоцианином (называемом DSAB-НК), является интегрин $\alpha v \beta 6$. В свою очередь DSAB-НК может вызвать иммунный ответ у хозяина. Также показано, что ФДТ в комбинации с иммунотерапией и ингибированием иммунного рецептора антителами анти-PD 1 может быть использована для эффективной терапии первичных опухолей и метастазов [27].

Поскольку состояние иммунной системы определяет и устойчивость защитных сил организма, и эффективность противоопухолевой терапии, представляется целесообразным провести анализ вовлеченности различных звеньев иммунитета в процессы, происходящие при фотодинамической терапии опухолей.

Механизм действия ФДТ

ФДТ — это процедура, которая включает три основных действующих компонента: фотосенсибилизатора (ФС), света определенной длины волны для возбуждения ФС и молекулярного кислорода [23, 24]. Фотодинамическая терапия опухолей и флуоресцентная диагностика онкологических заболеваний подразумевает введение в организм красителей. В последние годы онкологами исследуются возможности применения соединений порфириновой группы в диагностике и подавлении опухолевого роста. Порфирины способны к селективному накоплению в тканях опухоли, на этом свойстве и основывается диагностика и лечение ФДТ. Фотоактивацию гематопорфиринов проводят с помощью красного света $\lambda = 633$ нм, так как он является наиболее проникающим в ткани. Ограничение на применение этого способа накладывают следующие проблемы: трудоемкость метода и возможность осложнений; ограниченный спектр нозологических форм новообразований, реагирующих на этот вид ФДТ. Данный метод может применяться только при лечении опухолей малого размера, которые доступно расположены для освещения лазером.

Противоопухолевый иммунный ответ и ФДТ

Достоверно установлено, что живые клетки и ткани, содержащие эндогенный и экзогенный фотосенсибилизатор, под действием света повреждаются вследствие ряда ключевых первичных и вторичных процессов [7]. Первичные включают в себя некротическое, цитотоксическое и апоптогенное воздействие; вторичные объединяют воздействие иммунозависимое и ишемически опосредованное.

Наиболее эффективным методом лечения рака должен стать такой способ лечения, который приведет к регрессии и эрадикации опухоли, вследствие индукции системного противоопухолевого иммунитета уничтожая отдаленные метастазы без токсического воздействия на нормальные ткани. ФДТ может быть таким методом, так как способствует развитию острого воспаления и привлечению клеток иммунной системы для противоопухолевой борьбы. После ФДТ погибающие клетки посылают сигналы опасности, которые увеличивают презентацию антигенов для дендритных клеток (ДК) и привлекают антигенспецифические цитотоксические Т-клетки.

Однако этот механизм не единственный. В опухолевый очаг привлекаются также регуляторные Т-клетки (Treg), которые оказывают иммуносупрессивное воздействие [19]. Это важно для понимания механизмов регуляции ФДТ-индуцированного противоопухолевого иммунитета и успешного использования в терапии рака.

За последние 20 лет наше понимание целенаправленных исследований ФДТ-опосредованных противоопухолевых иммунных реакций улучшилось. Достигнуты значительные успехи в описании механизма воздействия ФДТ на иммунную систему и противоопухолевый иммунный ответ. Многообразие известных на сегодняшний день

противоопухолевых процессов, индуцированных после ФДТ, представлено наглядно на рисунке 1.

В настоящее время рассматривается три основных механизма противоопухолевого действия ФДТ – прямое повреждающее воздействие на опухолевые клетки, нарушение кровоснабжения опухоли за счет повреждения сосудов и элиминация злокачественных клеток за счет цитотоксического действия клеток иммунной системы вследствие развития острого воспаления.

Основным следствием действия ФДТ с использованием фотосенсибилизаторов является появление реактивных форм кислорода (РФК)

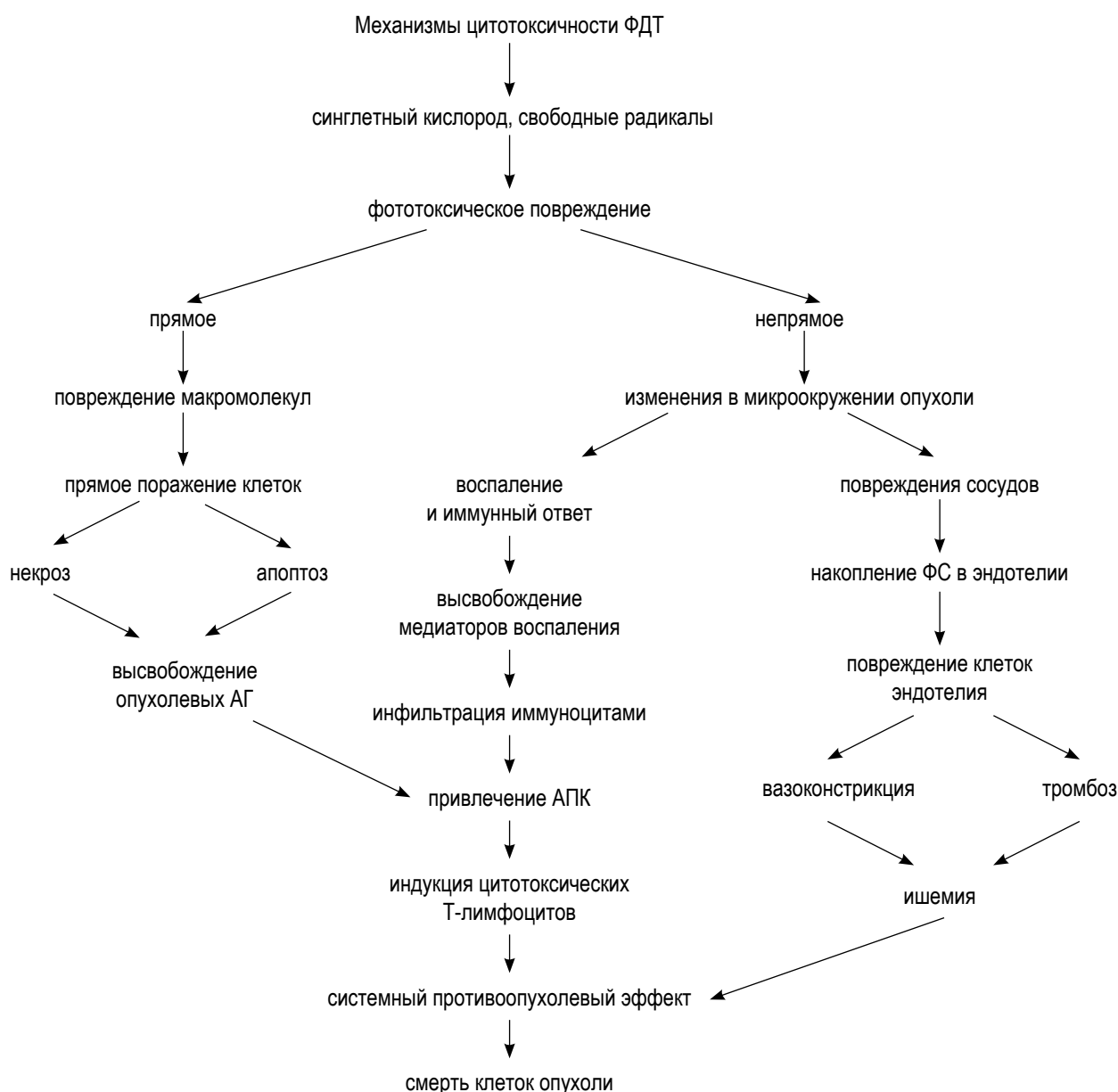


Рисунок 1. Механизм цитотоксического воздействия ФДТ на опухоль

Примечание. АГ – антиген, АПК – антигенпрезентирующие клетки, ФС – фотосенсибилизатор.

и фотохимическое окисление липидов клеточных мембран опухолевой ткани [43]. Фотосенсибилизатор, накопившийся в опухоли, поглощает свет и производит активную форму кислорода, которая и разрушает прилегающие клетки. Реактивные формы кислорода и синглетный кислород, образующиеся во время ФДТ, как известно, приводят к деструкции опухолей за счет различных механизмов. Они способны непосредственно убивать опухолевые клетки, вызывая некроз и/или апоптоз, приводить к разрушению сосудов опухоли и индуцировать острую воспалительную реакцию с помощью дендритных клеток и нейтрофилов [17, 19, 38, 51]. Фотоокислительные нарушения индуцируют выделение клетками медиаторов, провоцирующих местную воспалительную реакцию.

Также ФДТ активирует перекисное окисление липидов в клеточных мембранах и ферментативных системах эндотелия, которые являются ключевыми в повреждениях эндотелиальных клеток сосудов, наряду с другими клетками сосудистой стенки. Важно, что в результате действия ФДТ возможно разрушение сосудов, питающих опухоль, в результате чего происходит ишемия клеток опухоли и уменьшается их число. Возможна полная окклюзия сосудов, несущих кровь в опухоль, из-за фототоксических изменений эндотелия сосудов [25, 33]. Оксидативный стресс, индуцированный ФДТ, приводит к гибели клеток, нарушению трофики и оксигенации тканей как результат ишемических повреждений сосудов опухоли. Иницируя такие повреждения, ФДТ индуцирует высвобождение провоспалительных молекул и возникновение воспалительных иммунных реакций, при которых активируются клетки миелоидного ряда.

Таким образом, разрушение клеток и эндотелия сосудов опухоли служит пусковым фактором развития иммунных реакций. Преобладание того или иного процесса в развитии иммунитета, по видимому, зависит от характерных особенностей опухоли, типа фотосенсибилизатора и реактивности организма.

К месту локализации опухоли первыми из клеток иммунной системы поступают нейтрофилы [45, 58]. Они накапливаются в периваскулярной области и сосудах, питающих опухоль, происходит выделение токсических продуктов метаболизма кислорода и накопление лизосомальных ферментов, участвующих в индукции повреждений сосудов и клеток опухоли [40, 62]. Происходит быстрое разрушение активированных нейтрофилов, выделяются хемотаксические факторы, которые привлекают другие клетки-участники воспаления. Вскоре после инвазии нейтрофилами в опухоль растет число тучных

клеток [45]. В некоторых исследованиях было показано, что нейтрофилы способны также модулировать активность Т- и В-клеток с помощью интерлейкинов [18, 46].

Следующая волна инвазии опухоли макрофагами, моноцитами и другими иммунными клетками происходит из-за сигнала, подаваемого высвобождающимся содержимым гранул тучных клеток и хемоаттрактантами нейтрофилов [7]. Дальнейшая динамика повреждения тканей опухоли сильно зависит от опухоли-ассоциированных макрофагов, которые, по некоторым данным, могут накапливать порфирины в количествах, превышающих их содержание в клетках опухоли в 9 раз [32]. Происходит усиление продукции активных форм кислорода, противовоспалительных цитокинов, лизосомальных ферментов; также растет фагоцитарная активность макрофагов после ФДТ [54].

После проведения ФДТ у животных и человека было выявлено повышение уровня многочисленных цитокинов, таких как интерлейкин (IL)-1 β , IL-2, IL-6, IL-10, фактора некроза опухоли альфа (TNF α) [61]. Тем не менее, самым важным цитокином в исходе ФДТ является IL-1 β . Есть исследования, показывающие, что активность IL-1 β имеет решающее значение для терапевтической эффективности, так как его нейтрализация снижает частоту излечения ФДТ-обработанных опухолей в мышинной модели. Интересно, что блокирование противовоспалительных цитокинов, таких как IL-10 и TGF- β улучшали показатели эффективности ФДТ опухолей [42].

Показана эффективность использования активированных УФ мононуклеарных клеток крови для лечения саркомы Капоши на основании динамики клинической картины и периодов ремиссии заболевания, что связано с индукцией процессов противоопухолевого иммунологического надзора [9]. Исследования последних лет показали, что действие ФДТ может приводить к системной нейтрофилии, индукции белков острой фазы, увеличению уровня циркулирующих компонентов системы комплемента и высвобождению провоспалительных цитокинов. Все эти изменения указывают на наличие системного воспалительного процесса и активацию различных звеньев иммунитета [52]. Противоопухолевый иммунный ответ, который запускается стерильным воспалением, представляет собой важный процесс в удалении опухоли после ФДТ. Различные исследования на лабораторных животных показали, что активация иммунной системы после ФДТ необходима для полной ликвидации опухоли. Гибель опухолевых клеток, которая происходит непосредственно от фотохимического повреждения или в результате по-

вреждения сосудов, опосредует гипоксию, кислородное голодание и неполноценное питание опухоли, которое является ключевым событием, предшествующим противоопухолевому иммунному ответу [40, 41, 61].

Этапы иммунного ответа после ФДТ

Прямое цитотоксическое действие ФДТ приводит к повреждению липидного бислоя клеточных мембран и разрушению опухолевых клеток посредством некроза или апоптоза, что стимулирует противоопухолевый иммунитет, который развивается в несколько этапов [24]. В свою очередь, высвобождение мембранных фосфолипидов, продуктов арахидоновой кислоты и опухолевых антигенов привлекает в место повреждения клетки эффекторы [20, 30].

На первом этапе активируются привлеченные медиаторами воспаления опухоле-ассоциированные макрофаги и ДК, которые являются основными представителями антигенпредставляющих клеток. Они созревают после стимуляции цитокинами и реализуют процессы презентации антигенов опухолевых клеток иммунокомпетентным лимфоцитам в лимфоузлах с последующей стимуляцией цитотоксических Т-лимфоцитов и привлечением Т-хелперов (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки). Это приводит к активации клеток-хелперов CD4⁺Т-лимфоцитов и CD8⁺ цитотоксических Т-клеток, В-клеток и инициации адаптивного иммунного ответа [60].

В свою очередь, следующий этап каскада событий заключается в активации опухолеспецифических цитотоксических Т-клеток и НК-клеток (natural killer cells). Активированные Т-клетки становятся эффекторными и мигрируют к опухоли за счет хемоаттрактантов. Также в зону острого воспаления попадают НК-клетки, которые реализуют свои цитолитические функции и участвуют в лизисе опухолевых клеток. Известно, что реализация цитотоксического эффекта осуществляется двумя путями: 1) цитотоксические CD8⁺Т-клетки высвобождают перфорины при контакте с клетками-мишенями, разрушая их; 2) CD4⁺ и CD8⁺Т-клетки индуцируют апоптоз клетки-мишени через поверхностный FAS-лиганд. Таким образом, при ФДТ индуцируется преимущественно Т-клеточный иммунитет [31]. Избирательное удаление в эксперименте цитотоксических Т-клеток, нейтрофилов и макрофагов приводило к значительному подавлению противоопухолевого эффекта в результате ФДТ [39].

Важно, что клеточное звено доминирует в иммунном ответе, индуцированном ФДТ, это является его отличительной особенностью. Выявлено, что лизаты клеток опухоли, обработанных ФДТ, преимущественно активируют Т-клеточный им-

мунитет и обладают высокой иммуногенностью [31]. То есть ФДТ можно отнести к перспективным методам, актуальным в современной терапии рака, поскольку она активизирует различные механизмы лечебного действия, направленного на ликвидацию новообразований.

Доклинические и клинические исследования показали, что ФДТ способна воздействовать как на врожденные так и адаптивные механизмы иммунной системы. Иммуностимулирующие свойства ФДТ могут увеличить свои положительные эффекты терапии и дать более широкий потенциал для применения в клинической практике. Стимулируя опухоль-специфичные цитотоксические Т-клетки, способные уничтожать отдаленные необработанные опухолевые клетки, ФДТ приводит к развитию противоопухолевых клеток памяти, которые потенциально могут предотвратить рецидив рака [55]. Применение цитокинов способно стимулировать иммунный ответ на воздействие ФДТ [53]. Более того, выделенные из периферической крови цитотоксические лимфоциты после активации *in vitro* способны к развитию более выраженной противоопухолевой реакции [6].

Иммуностимулирующий эффект ФДТ породил направление сочетанного применения этого вида терапии и иммуномодулирующей терапии для достижения синергического эффекта при лечении опухолевых заболеваний.

Активация НК-клеток при ФДТ

Существует предположение о том, что НК-клетки могут непосредственно активироваться после локальной и системной ФДТ. Именно они играют важную роль в противоопухолевом иммунном ответе. На экспериментальной модели у животных с саркомой Meth-A показана активация НК-клеток после проведения ФДТ [40]. Элиминация НК-клеток с помощью анти-асиало-GM1-сыворотки приводила к подавлению фотодинамического эффекта с использованием фотосенсибилизатора бензофенотиазина.

Для того чтобы изучить вовлеченность НК-клеток в ФДТ-индуцированный иммунитет Kabingu и соавт. использовали иммунодефицитных (SCID) мышей без НК-клеток [37]. Для этого мышам подкожно и внутривенно были привиты опухолевые клетки EMT/6. После того как развилась опухоль, была проведена ФДТ. Через 10 дней после ФДТ у мышей с дефицитом НК-клеток количество опухолевых очагов в легких было значительно выше, чем у животных из контрольной группы. Авторы пришли к выводу, что НК-клетки могут играть важную роль в ФДТ-индуцированном противоопухолевом иммунном ответе и контроле образования отдаленных метастазов.

Кроме того, было показано, что НК-клеточная адаптивная иммунотерапия является весьма эф-

фективным адьювантом при фотодинамическом лечении злокачественных опухолей ЕМТ6 у иммунокомпетентных сингенных мышей BALB/c [44, 52]. Однако роль НК-клеток при ФДТ является не до конца ясной. Хорошо известно, что НК-клетки являются важными эффекторами врожденного иммунитета и участвуют в лизисе инфицированных вирусом и опухолевых клеток, у которых отсутствует поверхностная экспрессия молекул главного комплекса гистосовместимости 1 класса (МНС-I — major histocompatibility complex class I). Они обладают естественной цитолитической активностью, способны продуцировать цитокины и хемокины. Натуральные киллеры содержат азурофильные гранулы, в состав которых входят перфорин, гранзимы, гранулизины и другие компоненты, с помощью которых они осуществляют контактный цитоллиз. На разных стадиях развития НК-клетки экспрессируют множество рецепторов и поверхностных маркеров, характерных для клеток как миелоидного, так и лимфоидного происхождения, формируя гетерогенную смесь разнообразных субпопуляций [2]. Однако натуральные киллеры не обладают антигенспецифическими рецепторами, подобно тем, которые экспонируют Т- и В-клетки [1]. НК-клетки широко распространены в организме, они обнаруживаются в селезенке, печени, в периферической крови, в небольшом количестве в лимфоузлах, в децидуальной оболочке матки. Натуральные киллеры относятся к короткоживущим клеткам. Время их жизни составляет несколько дней, хотя в настоящее время обнаружено, что определенные НК-клетки могут персистировать в организме несколько месяцев. Наиболее важными функциями НК-клеток являются цитолитическая активность по отношению к клеткам-мишеням и секреция хемокинов и цитокинов, играющих важную роль в регуляции иммунного ответа. Цитоллиз клеток-мишеней идет независимо от антител и комплемента, что подтверждает название клеток — «естественные киллеры». Контактный цитоллиз, путем которого НК-клетки убивают чувствительные к лизису клетки-мишени, реализуется с участием цитотоксических гранул либо при непосредственном контакте с рецепторами «смерти» на поверхности клеток-мишеней (Fas, TRAIL и др.).

Функциональная активность НК-клеток регулируется растворимыми факторами, продуцируемыми окружающими клетками, и контактными взаимодействиями натуральных киллеров с потенциальными клетками-мишенями. Каждая НК-клетка несет на своей поверхности множество рецепторов хемокинов и цитокинов. Связывание этих рецепторов с соответствующими лигандами может влиять на развитие НК-клеток, индуцировать хемотаксис и пролиферацию,

приводить к изменению их цитотоксичности и продукции цитокинов. Посредством набора поверхностных рецепторов натуральные киллеры распознают на клетках-мишенях молекулы, экспрессия которых указывает на вирусную инфекцию, опухолеобразование или повреждение, вызванные клеточным стрессом. НК-клетки вовлечены в широкий спектр существенных биологических процессов в организме, играют критическую роль в иммунном надзоре и могут быть использованы в противоопухолевой терапии. Цитолитическая активность НК-клеток контролируется балансом сигналов между ингибирующими и стимулирующими рецепторами. Многие из этих молекул принадлежат к семейству иммуноглобулиноподобных рецепторов (семейство KIR) либо представляют собой лектиноподобные кальций-зависимые рецепторы (лектины типа C). Как те, так и другие могут ингибировать или активировать НК-клетки. Формирование определенного цитотоксического ответа НК-клетками зависит от комбинации на их поверхности различных активирующих и ингибирующих рецепторов, которые регулируют их функциональную активность [15]. Снижение или отсутствие ингибирующих сигналов приводит к преобладанию сигналов активации, что, в конечном итоге, ведет к лизису клетки-мишени и выбросу цитокинов. С другой стороны, высокая экспрессия активирующих лигандов на клетках-мишенях может привести к запуску цитолитической активности НК-клеток, несмотря на нормальную экспрессию молекул МНС-I. Важным представителем лектиноподобных активирующих рецепторов НК-клеток является гликопротеин типа II NKG2D. Помимо НК-клеток, этот рецептор экспрессируется на NKT-клетках, $\gamma\delta$ T-клетках и $CD8^+\alpha\beta$ T-клетках. Рецептор NKG2D способен узнавать высокополиморфные стресс-индуцируемые лиганды MICA, MICB (major histocompatibility complex class I chain-related protein A or B) и UL16-связывающие белки (ULBP), родственные антигенам МНС класса I. На поверхности здоровых клеток белки MICA/B могут содержаться в незначительном количестве, но чаще отсутствуют [5, 13]. Однако их экспрессия может индуцироваться в условиях клеточного стресса при повреждении ДНК, тепловом шоке, подавлении гистон-диацетилазы и окислительном стрессе, а также может многократно возрастать при опухолеобразовании [10, 11]. Взаимодействие лиганда MICA или MICB с рецептором NKG2D приводит к активации НК-клеток и субпопуляций Т-лимфоцитов и уничтожению измененных клеток [2, 3, 5]. Таким образом, экспрессия стресс-индуцированных молекул не только позволяет отторгать опухолевые клетки, но и стимулирует формирование длительного

противоопухолевого иммунитета. Показано, что при развитии опухолевого процесса с поверхности клеток молекулы МІСА могут сбрасываться. Таким образом, они обнаруживаются в сыворотке крови у онкологических больных. Достоверное увеличение количества sMICA в сыворотке крови онкологических больных по сравнению с контрольной группой было обнаружено у больных со следующими заболеваниями: неходжкинские лимфомы, рак гортаноглотки, рак молочной железы, рак шейки матки, а также рак толстого кишечника и желудка. Максимальные значения были зарегистрированы в группах пациентов с меланомой и неходжкинскими лимфомами [3, 4, 10]. Сывороточный уровень МІСА отрицательно коррелировал с экспрессией рецептора NKG2D на поверхности лимфоцитов. Данное явление вызывает анергию NK-клеток и имеет иммуносупрессивный эффект.

В последние годы стали появляться работы, в которых изучают эффекты фотосенсибилизаторов и фотодинамического воздействия на индукцию NKG2D-лигандов молекул МІСА на опухолевых клетках и увеличение цитотоксической активности NK-клеток. В единичных работах показано, что ФДТ индуцирует экспрессию МІСА на клетках аденокарциномы человека Colo205, клетках линии SNU-1 и SW-900 *in vitro* и на привитых опухолях CT26 у мышей *in vivo* [16, 52]. Адаптивный перенос NK-клеток мышам после ФДТ увеличивает долю лизированных опухолевых клеток, таким образом, являясь хорошим методом иммунотерапевтического воздействия в дополнение к ФДТ и существующей терапии. В цитотоксических тестах клетки с повышенной экспрессией NKG2D-лигандов лизировались NK-клетками человека более эффективно, чем контрольные. Можно сделать вывод, что ФДТ положительно влияет на поверхностную экспрессию NKG2D лигандов на опухолевых клетках, таким образом, повышая их чувствительность к NK-клеточной цитотоксичности [52, 63]. Показано, что сублетальная ФДТ приводит к увеличению способности NK-клеток лизировать опухолевые клетки путем положительного регулирования NKG2D-лигандов, предполагается, что эффект ФДТ может частично зависеть от индукции NKG2D-лигандов на опухолевых клетках, которые выжили после воздействия ФДТ и их восприимчивости к NK-клеткам через ассоциацию с адаптерными молекулами DAP10, которые воспринимают сигнал, возникающий при связывании рецептора NKG2D на поверхности лимфоцитов со стресс-индуцированными молекулами МІСА на поверхности клеток-мишеней, и осуществляют его дальнейшую передачу, индуцирующую цитотоксическое действие лимфоцита. Таким образом, экспрессия стресс-

индуцированных молекул приводит к иммунологическому уничтожению трансформированной клетки. Этот феномен может являться свидетельством активации врожденного звена иммунитета за счет физико-химических механизмов фотодинамического воздействия на иммунную систему человека и запуск каскадных реакций, приводящих к усилению противоопухолевого иммунного ответа в целом.

Супрессивный эффект ФДТ

Однако результатом ФДТ опухолей могут быть не только иммуностимулирующие, но и иммуносупрессорные эффекты, возникающие в результате применения высоких доз лазерного излучения и/или фотосенсибилизатора. Известны феномены подавления активации Т-лимфоцитов после ФДТ, удлинение времени приживления кожного трансплантата и другие иммуносупрессорные проявления [47].

Было высказано предположение, что схемы лечения ФДТ, вызывающие высокую степень острого воспаления лучше при активации иммунной системы по сравнению с теми, в которых острое воспаление выражено слабее. Тем не менее увеличение воспалительных медиаторов может способствовать росту опухолевых клеток при определенных обстоятельствах [56]. Кроме того, эффект ФДТ был также связан с иммуносупрессивным воздействием. Такие иммуносупрессивные эффекты были установлены в модели подавления индукции контактной гиперчувствительности (т.е. афферентного иммунного ответа), которая включает в себя применение кожной аппликации гаптена, с последующим повторением [48], и подавление реакции гиперчувствительности замедленного типа (на примере Манту) (т.е. эфферентной иммунный ответ), например, у здоровых Манту-положительных добровольцев [47, 57]. В частности, такие иммуносупрессивные ответы, как представляется, зависят от скорости доставки света [26] и анатомических особенностей области ФДТ [49].

Дальнейшие исследования с использованием более целенаправленной ФДТ с контролем дозы ФД воздействия помогут расширить наши знания об активации и подавлении иммунной системы, а также дадут возможность ее совершенствования в клинической практике.

Заключение

Анализ опыта использования ФДТ в медицине и наличия различных биологических эффектов приводит к обоснованному выводу о необходимости изучения взаимодействия электромагнитного излучения, прежде всего, с иммунной системой, а также другими системами, участвующими в защитных реакциях организма.

Многие исследования в доклинических и клинических испытаниях показали, что ФДТ способна активировать врожденный и адаптивный иммунитет. Такое воздействие на иммунную систему зависит от степени воспаления, вызванного ФДТ.

За счет доказанных эффектов ФДТ она может быть успешно использована в сочетании с другими методами лечения, для борьбы с раком и для достижения долгосрочного контроля над опухолью. Тем не менее, до сих пор применение ФДТ в клинической практике ограничено. Мы должны понимать, что потребуется время для исследований и клинических испытаний, прежде чем использование ФДТ станет стандартной практикой для лечения онкологических больных.

Показано, что ФДТ вызывает многообразные иммунологические сдвиги в процессе применения при противоопухолевой терапии. Знание причин и закономерностей этих изменений позволит направленно их использовать для повы-

шения эффективности комплексной терапии онкологических заболеваний.

Дальнейшее изучение этих механизмов в регуляции функциональной активности эффекторных лимфоцитов человека поможет разобраться в процессах направленного воздействия ФДТ на адаптивный иммунный ответ, а также даст основу для разработки новых терапевтических подходов, основанных на сочетании использования свойств лимфоцитов и ФДТ при лечении злокачественных новообразований. Потребуется много лет интенсивных исследований, чтобы получить ответы на многие интригующие вопросы использования ФДТ для направленной активации иммунитета.

Результаты настоящего обзора могут послужить еще одним научным обоснованием для разработки рекомендаций по использованию ФДТ в медицинской практике и включения ее в комплексные подходы лечения злокачественных новообразований.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В. Роль стресс-индуцированных молекул MICA/B в противоопухолевом иммунном ответе // Злокачественные опухоли, 2012. Т. 2, № 2. С. 103-105. [Abakushina E.V. The role of stress-induced molecules MICA/B in the anti-tumor immune response. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors*, 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 103-105. (In Russ.)]
2. Абакушина Е.В. Метод проточной цитометрии для оценки NK-клеток и их активности // Клиническая лабораторная диагностика, 2015. Т. 60, № 11. С. 37-44. [Abakushina E.V. The technique of flow cytometry in evaluation of NK-cells and their activity. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Clinical Laboratory Diagnostics*, 2015, Vol. 60, no. 11, pp. 37-44. (In Russ.)]
3. Абакушина Е.В., Клинова А.В., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул MICA при онкологических заболеваниях // Молекулярная медицина, 2014. № 3. С. 34-38. [Abakushina E.V., Klinkova A.V., Kanevsky L.M., Kovalenko E.I. Elevation of serum levels of soluble forms of stress-induced molecules MICA in oncological diseases. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2014, no. 3, pp. 34-38. (In Russ.)]
4. Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Неприна Г.С., Пасова И.А., Бердов Б.А., Клинова А.В., Коваленко Е.И., Каприн А.Д. Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул MICA в сыворотке крови больных раком желудка и толстой кишки // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 63-67. [Abakushina E.V., Abakushin D.N., Neprina G.S., Pasova I.A., Berdov B.A., Klinkova A.V., Kovalenko E.I., Kaprin A.D. Elevation of serum levels of cytokines and stress-induced molecules MICA in patients with gaster and colon cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 63-67. (In Russ.)]
5. Абакушина Е.В., Романко Ю.С., Каплан М.А., Каприн А.Д. Противоопухолевый иммунный ответ и фотодинамическая терапия // Радиация и риск, 2014. Т. 23, № 4. С. 92-98. [Abakushina E.V., Romanko Yu.S., Kaplan M.A., Kaprin A.D. Anticancer immune response and photodynamic therapy. *Radiatsiya i risk = Radiation and Risk*, 2014, Vol. 23, no. 4, pp. 92-98. (In Russ.)]
6. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* // Гены и клетки, 2015. Т. 10, № 2. С. 78-85. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S. Efficiency of IL-2 and IL-15 combined use for activation of cytotoxic lymphocytes *in vitro*. *Geny i клетки = Gene and Cells*, 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 78-85. (In Russ.)]
7. Васильев Н.Е., Сысоева Г.М., Даниленко Е.Д. Иммунологические аспекты фотодинамической терапии // Медицинская иммунология, 2003. Т. 5, № 5-6. С. 507-518. [Vasiliev N.E., Sysoev G.M., Danilenko E.D. Immunological aspects of photodynamic therapy. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, Vol. 5, no. 5-6, pp. 507-518. (In Russ.)]
8. Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные образования в России в 2013 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «ФМИЦ им. П.А. Герцена» Министерства здравоохранения РФ, 2015. 250 с. [Kaprin A.D., Starinsky V.V., Petrova G.V. Malignant tumors in Russia in 2013 (morbidity and mortality)]. Moscow: P. Hertsen Moscow Oncology Research Institute – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, 2015. 250 p.

9. Карташова М.Г., Кильдюшевский А.В., Молочков А.В., Федулкина В.А. Трансляционная клеточная иммунотерапия идиотипического и иммуносупрессивного типов саркомы Капоши // Российский журнал кожных и венерических болезней, 2013. № 3. С. 13-18. [Kartashova M.G., Kildyushevsky A.V., Molochkov A.V., Fedulkina V.A. Translation cellular immunotherapy of idiopathic and immunosuppressive kaposi's sarcoma. *Rossiiskij zhurnal kozhnyh i venericheskikh boleznej* = *Russian Journal of Skin and Venereal Diseases*, 2013, no. 3, pp. 13-18. (In Russ.)]
10. Клинова А.В., Кузьмина Е.Г., Абакушина Е.В., Каневский Л.М., Неприна Г.С., Павлов В.В., Коваленко Е.И. Циркулирующий белок MICA у больных злокачественными лимфомами // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 151-162. [Klinkova A.V., Kuzmina E.G., Abakushina E.V., Kanevsky L.M., Neprina G.S., Pavlov V.V., Kovalenko E.I. Circulating MICA protein in the patients with malignant lymphomas. *Meditsinskaya Immunologiya* = *Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 151-162. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-2-151-162>
11. Коваленко Е.И., Стрельникова Ю.И., Каневский Л.М., Абакушина Е.В. Влияние стресс-индуцируемой молекулы MICA на активность NK-клеток человека // Омский научный вестник, 2007. № 3 (61). С. 29-31. [Kovalenko E.I., Strelnikova Yu.I., Konevsky L.M., Abakushina E.V. Influence of stress-induced molecule MICA on the activity of human NK-cells. *Omsky nauchniy vestnik* = *Omsk Scientific Bulletin*, 2007, no. 3 (61), pp. 29-31. (In Russ.)]
12. Кузнецов В.В. Использование фотодинамической терапии в отечественной онкологии // Исследования и практика в медицине, 2015. Т. 2, № 4. С. 98-105. [Kuznetsov V.V. The use of photodynamic therapy in the domestic oncology. *Issledovaniya i praktika v meditsine* = *Research and Practice in Medicine*, 2015, Vol. 2, no. 4, pp. 98-105. (In Russ.)]
13. Маризина Ю.В., Абакушина Е.В., Неприна Г.С., Пасова И.А. NKG2D иммунорецептор и его лиганды в периферической крови больных меланомой и раком кишечника // Злокачественные опухоли, 2015. № 4, спецвыпуск 2. С. 313. [Marizina Yu.V., Abakushina E.V., Neprina G.S., Pasova I.A. NKG2D immunoreceptor and its ligands in peripheral blood of patients with melanoma and colon cancer. *Zlokachestvennye opukholi* = *Malignant Tumors*, 2015, no. 4, p. 313. (In Russ.)]
14. Чернышев И.В., Алтунин Д.В., Самсонов Ю.В., Каллаев К.К. Новые возможности фотодинамической диагностики и лечения рака предстательной железы и почки // Экспериментальная и клиническая урология, 2011. № 2-3. С. 92-94. [Chernyshev I.V., Altunin D.V., Samsonov Yu.V., Kallaev K.K. Photodynamic methods of diagnostics and treatment of prostate and kidney cancer: new possibilities. *Ekspperimental'naya i klinicheskaya urologiya* = *Experimental and Clinical Urology*, 2011, Vol. 2-3, pp. 92-94. (In Russ.)]
15. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999, Vol. 285, pp. 727-729.
16. Belicha-Villanueva A., Riddell J., Naveen B., Gollnick S.O. The Effect of Photodynamic Therapy on Tumor Cell Expression of Major Histocompatibility Complex (MHC) Class I and MHC Class I-Related. *Molecules Lasers Surg. Med.*, 2012, Vol. 44, no. 1, pp. 60-68.
17. Buytaert E., Dewaele M., Agostinis P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim. Biophys. Acta*, 2007, Vol. 1776, pp. 86-107.
18. Cassatella M.A. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. *Adv. Immunol.*, 1999, Vol. 73, pp. 369-509.
19. Castano A.P., Mroz P., Hamblin M.R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity. *Nat. Rev. Cancer*, 2006, no. 6, pp. 535-545.
20. Cecic I., Korblic M. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Lett.*, 2002, Vol. 183, no. 1, pp. 43-51.
21. Chen W.R., Adams R.L., Carubelli R., Nordquist R.E. Laser-photosensitizer assisted immunotherapy: a novel modality for cancer treatment. *Cancer Lett.*, 1997, Vol. 115, no. 1, pp. 25-30.
22. Cruz L.B., Ribeiro A.S., Rech A., Rosa L.G., Castro C.G.Jr., Brunetto A.L. Influence of low-energy laser in the prevention of oral mucositis in children with cancer receiving chemotherapy. *Pediatr. Blood Cancer*, 2007, Vol. 48, no. 4, pp. 435-440.
23. Dolmans D.E., Fukumura D., Jain R.K. Photodynamic therapy for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2003, no. 3, pp. 380-387.
24. Dougherty T.J., Gomer C.J., Henderson B.W., Jori G., Kessel D., Korblic M., Moan J., Peng Q. Photodynamic therapy. *J. Natl. Cancer Inst.*, 1998, Vol. 90, no. 12, pp. 889-905.
25. Fingar V.H., Wieman T.J., Doak K.W. Role of thromboxane and prostacyclin release on photodynamic therapy-induced tumor destruction. *Cancer Res.*, 1990, Vol. 50, no. 9, pp. 2599-2603.
26. Frost G.A., Halliday G.M., Damian D.L. Photodynamic therapy-induced immunosuppression in humans is prevented by reducing the rate of light delivery. *J. Invest. Dermatol.*, 2011, Vol. 131, pp. 962-968.
27. Gao L., Zhang C., Gao D., Liu H., Yu X., Lai J., Wang F., Lin J., Liu Z. Enhanced Anti-Tumor Efficacy through a Combination of Integrin $\alpha\beta 6$ -Targeted Photodynamic Therapy and Immune Checkpoint Inhibition. *Theranostics*, 2016, Vol. 6, no. 5, pp. 627-637.
28. Genot M.T., Klastersky J. Low-level laser for prevention and therapy of oral mucositis induced by chemotherapy or radiotherapy. *Curr. Opin. Oncol.*, 2005, Vol. 17, no. 3, pp. 236-240.
29. Gholamreza Esmaeeli D., Emami A., Ataie-Fashtami L., Safaeinodahi S.R., Merikh-Baiat F., Fateh M., Zand N. Low Level laser therapy in management of chemotherapy-induced oral mucositis: prophylaxis or treatment? *J. Laser Med. Sci.*, 2011, Vol. 2, no. 1, pp. 12-17.

30. Gollnick S.O., Liu X., Owczarczak B., Musser D.A., Henderson B.W. Altered expression of interleukin 6 and interleukin 10 as result of photodynamic therapy *in vitro*. *Cancer Res.*, 1997, Vol. 57, no. 18, pp. 3904-3909.
31. Gollnick S.O., Vaughan L., Henderson B.W. Generation of effective antitumor vaccines using photodynamic therapy. *Cancer Res.*, 2002, Vol. 62, no. 6, pp. 1604-1608.
32. Hamblin M.R., Newman E.L. On the mechanism of the tumour-localising effect in photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol.*, 1994, Vol. 23, no. 1, pp. 3-8.
33. Henderson B.W., Dougherty T.J. How does photodynamic therapy work? *Photochem. Photobiol.*, 1992, Vol. 55, no. 1, pp. 145-157.
34. Hillemanns P., Garcia F., Petry K.U., Dvorak V., Sadovsky O., Iversen O.E., Einstein M.H. A randomized study of hexaminolevulinate photodynamic therapy in patients with cervical intraepithelial neoplasia. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 2015, Vol. 212, no. 4, pp. 465.e1-465.e7.
35. Hugget M.T., Jermyn M., Gillams A., Illing R., Mosse S., Novelli M., Kent E., Bown S.G., Hasan T., Pogue B.W., Pereira S.P. Phase I/II study of verteporfin photodynamic therapy in locally advanced pancreatic cancer. *Br. J. Cancer*, 2014, Vol. 110, no. 7, pp. 1698-1704.
36. Jalili A., Makowski M., Switaj T., Nowis D., Wilczynski G.M., Wilczek E., Chorazy-Massalska M., Radzikowska A., Maslinski W., Biały L., Sienko J., Sieron A., Adamek M., Basak G., Mróz P., Krasnodebski I.W., Jakóbsiak M., Gołab J. Effective photoimmunotherapy of murine colon carcinoma induced by the combination of photodynamic therapy and dendritic cells. *Clin. Cancer Res.*, 2004, Vol. 13, pp. 4498-4508.
37. Kabingu E., Vaughan L., Owczarczak B., Ramsey K.D., Gollnick S.O. CD8⁺ T cell-mediated control of distant tumours following local photodynamic therapy is independent of CD4⁺ T cells and dependent on natural killer cells. *Br. J. Cancer*, 2007, Vol. 96, no. 12, pp. 1839-1848.
38. Korbelik M., Cecic I., Merchant S., Sun J. Acute phase response induction by cancer treatment with photodynamic therapy. *Int. J. Cancer*, 2008, Vol. 122, no. 6, pp. 1411-1417.
39. Korbelik M., Cecic I. Contribution of myeloid and lymphoid host cells to the curative outcome of mouse sarcoma treatment by photodynamic therapy. *Cancer Letters*, 1999, Vol. 137, pp. 91-98.
40. Korbelik M., Dougherty G.J. Photodynamic therapy-mediated immune response against subcutaneous mouse tumors. *Cancer Res.*, 1999, Vol. 59, no. 8, pp. 1941-1946.
41. Korbelik M., Krosł G., Krosł J., Dougherty G.J. The role of host lymphoid populations in the response of mouse EMT6 tumor to photodynamic therapy. *Cancer Research*, 1996, Vol. 56, pp. 5647-5652.
42. Korbelik M. PDT-associated host response and its role in the therapy outcome. *Lasers Surg. Med.*, 2006, Vol. 38, no. 5, pp. 500-508.
43. Korbelik M., Krosł G. Enhanced macrophage cytotoxicity against tumor cells treated with photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.*, 1994, Vol. 60, pp. 497-502.
44. Korbelik M., Sun J. Cancer treatment by photodynamic therapy combined with adoptive immunotherapy using genetically altered natural killer cell line. *Int. J. Cancer*, 2001, Vol. 93, pp. 269-274.
45. Krosł G., Korbelik M., Dougherty G.J. Induction of immune cell infiltration into murine SCCVII tumour by photofrin-based photodynamic therapy. *Br. J. Cancer*, 1995, Vol. 71, no. 3, pp. 549-555.
46. Lloyd A.R., Oppenheim J.J. Poly's lament: the neglected role of the polymorphonuclear neutrophil in the afferent limb of the immune response. *Immunol. Today*, 1992, Vol. 13, no. 5, pp. 169-172.
47. Matthews YJ, Damian DL. Topical photodynamic therapy is immunosuppressive in humans. *Br. J. Dermatol.*, 2010, Vol. 162, pp. 637-641.
48. Mroz P., Hamblin M.R. The immunosuppressive side of PDT. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2011, Vol. 10, pp. 751-758.
49. Musser D.A., Camacho S.H., Manderscheid P.A., Oseroff A.R. The anatomic site of photodynamic therapy is a determinant for immunosuppression in a murine model. *Photochem. Photobiol.*, 1999, Vol. 69, no. 2, pp. 222-225.
50. Nes A.G., Posso M.B. Patients with moderate chemotherapy-induced mucositis: pain therapy using low intensity lasers. *Int. Nurs. Rev.*, 2005, Vol. 52, no. 1, pp. 68-72.
51. Ortel B., Shea C.R., Calzavara-Pinton P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. *Front. Biosci.*, 2009, Vol. 14, pp. 4157-4172.
52. Park M.J., Bae J.H., Chung J.S., Kim S.H., Kang C.D. Induction of NKG2D ligands and increased sensitivity of tumor cells to NK cell-mediated cytotoxicity by hematoporphyrin-based photodynamic therapy. *Immunol. Investigat.*, 2011, Vol. 40, pp. 367-382.
53. Piette J. Signalling pathway activation by photodynamic therapy: NF-κB at the crossroad between oncology and immunology. *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2015, Vol. 14, no. 8, pp. 1510-1517.
54. Qin B., Selman S.H., Payne K.M., Keck R.W., Metzger D.W. Enhanced skin allograft survival after photodynamic therapy. Association with lymphocyte inactivation and macrophage stimulation. *Transplantation*, 1993, Vol. 56, no. 6, pp. 1481-1486.
55. Reginato E., Wolf P., Hamblin M.R. Immune response after photodynamic therapy increases anti-cancer and anti-bacterial effects. *World J. Immunol.*, 2014, Vol. 4, no. 1, pp. 1-11.
56. Sgambato A., Cittadini A. Inflammation and cancer: a multifaceted link. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2010, Vol. 14, pp. 263-268.
57. Thanos S.M., Halliday G.M., Damian D.L. Nicotinamide reduces photodynamic therapy-induced immunosuppression in humans. *Br. J. Dermatol.*, 2012, Vol. 167, pp. 631-636.

58. de Vree W.J., Essers M.C., de Bruijn H.S., Star W.M., Koster J.F., Sluiter W. Evidence for an important role of neutrophils in the efficacy of photodynamic therapy *in vivo*. *Cancer Res.*, 1996, Vol. 56, no. 13, pp. 2908-2911.
59. Wachowska M., Gabrysiak M., Muchowicz A., Bednarek W., Barankiewicz J., Rygiel T., Boon L., Mroz P., Hamblin M.R., Golab J. 5-Aza-2'-deoxycytidine potentiates antitumour immune response induced by photodynamic therapy. *Eur. J. Cancer*, 2014, Vol. 7, pp. 1370-1381.
60. Wachowska M., Muchowicz A., Golab J. Targeting epigenetic processes in photodynamic therapy-induced anticancer immunity. *Front. Oncol.*, 2015, Vol. 5, p. 176.
61. Wachowska M., Muchowicz A., Demkow U. Immunological aspects of antitumor photodynamic therapy outcome. *Cent. Eur. J. Immunol.*, 2015, Vol. 40, no. 4, pp. 481-485.
62. Wieman T.J., Mang T.S., Fingar V.H., Hill T.G., Reed M.W., Corey T.S., Nguyen V.Q., Render E.R.Jr. Effect of photodynamic therapy on blood flow in normal and tumor vessels. *Surgery*, 1988, Vol. 104, no. 3, pp. 512-517.
63. Zhang C., Wang Y., Zhou Z., Zhang J., Tian Z. Sodium butyrate upregulates expression of NKG2D ligand MICA/B in HeLa and HepG2 cell lines and increases their susceptibility to NK lyses. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2009, Vol. 58, pp. 1275-1285.

Авторы:

Анохин Ю.Н. — к.м.н., заведующий кафедрой радионуклидной медицины ИАТЭ Национальный исследовательский ядерный университет «Московский инженерно-физический институт»; ведущий научный сотрудник отдела комбинированных воздействий, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Абакушина Е.В. — к.м.н., доцент кафедры радионуклидной медицины ИАТЭ Национальный исследовательский ядерный университет «Московский инженерно-физический институт»; старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Authors:

Anokhin Yu.N., PhD (Medicine), Head, Nuclear Medicine Department, National Research Nuclear University "Moscow Engineering Physics Institute"; Leading Research Associate, Department of Combined Effects, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Radionuclide Medicine, National Research Nuclear University "Moscow Engineering Physics Institute"; Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Russian Federation

Поступила 03.06.2016
Отправлена на доработку 20.06.2016
Принята к печати 06.07.2016

Received 03.06.2016
Revision received 20.06.2016
Accepted 06.07.2016

ИССЛЕДОВАНИЕ ПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ КАНДИДАТНОЙ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ РОТАВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАНТНОГО БЕЛКА FliCVP6VP8

Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А., Симбирцев А.С.

ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Большинство детей инфицируется до достижения 5-летнего возраста. В России заболеваемость ротавирусной инфекцией постоянно растет, что объясняется как увеличением числа случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания. Иммуитет к ротавирусной инфекции нестойкий, поэтому заболевание может повторяться в течение жизни. Невосприимчивость у переболевших обусловлена формированием не только IgM- и IgG-, но и IgA-специфичных антител. На данный момент на мировом рынке отсутствуют препараты с прямым противоротавирусным действием, ввиду этого самым эффективным способом борьбы с данным заболеванием считается своевременная вакцинация. Существующие в настоящее время вакцины для профилактики ротавирусной инфекции основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного. В данной работе изучали протективную активность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции. Активный агент кандидатной вакцины — белок FliCVP6VP8 — включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, а также компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC в качестве адъюванта, компоненты соединены гибкими мостиками. Целью данного исследования было изучение эффективности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного FliCVP6VP8 на модели ротавирусной инфекции на лабораторных мышах линии Balb/c. Был показан высокий уровень защиты, возникающий при двукратном внутримышечном введении кандидатной вакцины. Полная защита от мышинного ротавируса EDC после его перорального введения иммунизированным кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции животным ассоциировалась с продукцией вирусспецифичных IgA и IgG в кишечнике животных и в сыворотке крови. Эффективность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 сопоставима с таковой коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline) при большей безопасности кандидатной вакцины, за счет отсутствия живого вируса в ее составе. Таким образом, полученные результаты говорят о целесообразности проведения дальнейших доклинических испытаний кандидатной противоротавирусной вакцины на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8.

Ключевые слова: ротавирусный гастроэнтерит, вакцина, протективность, лабораторная модель ротавирусной инфекции.

Адрес для переписки:

Духовлинов Илья Владимирович
ФГУП «Государственный научно-исследовательский
институт особо чистых биопрепаратов»
ФМБА России
197110, Россия, Санкт-Петербург, ул. Пудожская, 7.
Тел.: 8 (981) 881-82-01.
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Address for correspondence:

Dukhovlinov Ilya V.
State Research Institute of Highly Pure Biopreparations,
Federal Agency for Medicine and Biology
197110, Russian Federation, St. Petersburg,
Pudzhskaya str., 7.
Phone: 7 (981) 881-82-01.
E-mail: dukhovlinov@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Духовлинов, Е.Г. Богомолова, Е.А. Федорова,
А.С. Симбирцев «Исследование протективной активности
кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции
на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 417-424.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-417-424

© Духовлинов И.В. и соавт., 2016

For citation:

I.V. Dukhovlinov, E.G. Bogomolova, E.A. Fedorova,
A.S. Simbirtsev "Protective activity study of a candidate vaccine
against rotavirus infection based on recombinant protein
FliCVP6VP8", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 417-424.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-417-424

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-417-424>

PROTECTIVE ACTIVITY STUDY OF A CANDIDATE VACCINE AGAINST ROTAVIRUS INFECTION BASED ON RECOMBINANT PROTEIN FliCVP6VP8

Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A.S.

State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Rotavirus infection is among leading causes of severe diarrhea which often leads to severe dehydration, especially, in children under 5 years old. In Russia, the incidence of rotavirus infection is constantly increased, due to higher rates of actual rotavirus infection cases and improved diagnostics of the disease. Immunity to rotavirus is unstable, thus causing repeated infections *intra vitam*. Anti-infectious resistance in reconvalescents is explained by induction of specific IgM, IgG, and, notably, IgA antibodies. Due to absence of market drugs with direct action against rotavirus, a rational vaccination is considered the most effective way to control the disease. Currently available vaccines for prevention of rotavirus infection are based on live attenuated rotavirus strains, human and/or animal origin, which replicate in human gut. Their implementation may result into different complications. Meanwhile, usage of vaccines based on recombinant proteins is aimed to avoid risks associated with introduction of a complete virus into humans. In this paper, we studied protective activity of candidate vaccines against rotavirus.

In this work we studied protective activity of a candidate vaccine against rotavirus infection based on recombinant FliCVP6VP8 protein which includes VP6 and VP8, as well as components of *Salmonella typhimurium* flagellin (FliC) as an adjuvant. Different components are joined by flexible bridges. Efficiency of the candidate vaccine was studied in animal model using Balb/c mice. We have shown high level of protection which occurs when the candidate vaccine is administered twice intramuscularly. Complete protection of animals against mouse rotavirus EDC after intramuscular immunization with a candidate vaccine was associated with arising rotavirus-specific IgA and IgG antibodies in serum and intestine of immunized animals. The efficacy of candidate vaccine based on recombinant protein FliCVP6VP8 against rotavirus infection was comparable to that of commercial Rotarix® vaccine (Glaxo Smith Kline), however, with higher safety of the candidate vaccine, due to absence of live virus in its composition. Hence, the results obtained justify further pre-clinical studies of the candidate vaccine based on a recombinant protein.

Keywords: rotavirus gastroenteritis, vaccine, recombinant fusion proteins, mouse model, protective activity

Введение

По данным Всемирной организации здравоохранения, ротавирусы являются одной из ведущих причин возникновения тяжелой диареи, приводящей к дегидратации организма у детей младшего возраста. Большинство детей инфицируется до достижения 5-летнего возраста. В России заболеваемость ротавирусной инфекцией постоянно растет, что объясняется как увеличением числа случаев инфицирования, так и совершенствованием способов диагностики данного заболевания.

Ротавирус был открыт сравнительно недавно, лишь в начале 70-х годов прошлого века [1]. Ротавирусы включают в семейство Reoviridae, род Rotavirus. Ротавирион представляет собой безоболочечный, сложноорганизованный трехслойный белковый капсид, который окружает

геном, представленный 11 сегментами двуцепочечной РНК [2].

Ротавирусы повреждают энтероциты, расположенные на микроворсинках тонкого кишечника, что приводит к снижению абсорбции и диарее. Широкий спектр клинических проявлений колеблется от преходящей легкой диареи до тяжелой диареи и рвоты, вызывающих дегидратацию, нарушение электролитного баланса, шок и при отсутствии лечения смерть.

Иммунитет к ротавирусной инфекции в большинстве случаев возникает в раннем детстве после перенесенного заболевания. Иммунитет нестойкий, поэтому у взрослых с низким уровнем антител заболевание может повториться. Невосприимчивость у переболевших обусловлена формированием не только IgM- и IgG-, но и IgA-антител.

Существующие в настоящее время вакцины для профилактики ротавирусной инфекции основаны на живых аттенуированных штаммах ротавируса человеческого и/или животного происхождения, которые размножаются в кишечнике человека. Использование вакцин на основе рекомбинантных белков позволяет избежать рисков, связанных с введением вируса в организм, пусть и аттенуированного.

Активный агент кандидатной вакцины — белок FliCVP6VP8 — включает фрагмент белка VP6, фрагмент белка VP8 ротавируса А, а также компоненты флагеллина *Salmonella typhimurium* FliC в качестве адъюванта, компоненты соединены гибкими мостиками [3]. Полипептид внутреннего капсида VP6 является мажорным белком вириона, в экспериментах на лабораторных мышах показано, что он обеспечивает защиту новорожденных животных за счет индукции выработки нейтрализующих секреторных антител у беременных самок [4]. Выбранный фрагмент VP6 в составе гибридного белка имеет общие и гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса С, а также гомологичные участки с фрагментом белка VP6 ротавируса В. Белок VP8 — N-концевой триптический фрагмент белка VP4 — является высокоиммуногенным полипептидом и индуцирует эффективную защиту против заболевания. Таким образом, представленные фрагменты являются консервативными частями белков VP6 и VP8, к которым в процессе естественной инфекции образуются специфичные антитела. Данные антитела перекрестно реагируют с эпитопами среди различных штаммов ротавирусов А, В и С, гомологичными представленным фрагментам гибридного белка. Использование эпитопов нескольких белков увеличивает эффективность вакцины, а использование гибких мостиков между эпитопами позволяет сохранить правильную пространственную укладку белка и, соответственно, обеспечивает полноценное функционирование каждого эпитопа. Использование безопасного и высокоэффективного адъюванта на основе гибридного белка, содержащего фрагменты доменов FliC *Salmonella typhimurium*, позволяет увеличить степень его иммуногенности [5].

Целью данного исследования было изучение эффективности кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного FliCVP6VP8 на модели ротавирусной инфекции на лабораторных мышах.

Материалы и методы

Препарат кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции

Вакцина включает рекомбинантный белок FliCVP6VP8, представленный иммуногенными

эпитопами поверхностных белков ротавируса VP6, VP8, а также белка FliC-компонента флагеллы *Salmonella typhimurium*, соединенными гибкими мостиками, и гидроксид алюминия в качестве адъюванта. Белок получен с использованием технологии рекомбинантной ДНК, работа велась на культуре клеток *E. coli*.

Состав: 1 доза (0,5 мл) содержит активное вещество: 20 мкг высокоочищенного рекомбинантного белка FliCVP6VP8, гидроксид алюминия (адъювант) 0,5 мг; компоненты буфера: маннитол 25 мг, натрия сукцинат 0,36 мг, полисорбат-20 0,05 мг, вода для инъекций до 0,5 мл.

Препарат сравнения

В качестве препарата сравнения использовали моновалентную живую ротавирусную вакцину для орального применения Rotarix® (GlaxoSmithKline) (серия 81/234, срок годности до XII-2017).

Rotarix® представляет собой жидкую живую моновалентную вакцину аттенуированного штамма человеческого ротавируса RIX4414 (G1 и не-G1 серотипы: G2, G3, G4, G9), культивируемого на клетках Веро. Вакцина предназначена для профилактики ротавирусной инфекции и выпускается в виде суспензии для приема внутрь (1,5 мл/1 доза в полиэтиленовой тубе).

Состав: 1 доза (1,5 мл) содержит: живой ослабленный ротавирус человека (штамм RIX4414). Вспомогательные вещества: сахароза, динатрия адипат, среда DMEM, вода стерильная.

Контрольное вещество

В качестве контрольного вещества использовали физиологический раствор (0,9% раствор хлорида натрия).

Лабораторные животные

В экспериментах использовали самок мышей линии BALB/c 9-12-недельного возраста, которых содержали в стандартном виварии. Мыши поступили из питомника РАН «Рапполово» Ленинградской области.

Животных содержали в соответствии с правилами, принятыми в Европейской конвенции по защите позвоночных животных (Страсбург, 1986). Мыши находились по 10 особей в пластиковых клетках фирмы VELAZ на подстилке из мелкой древесной стружки.

Кормление животных — дважды в день. Регламентирующий документ на содержание животных: «Лабораторные животные». М., 2003. Содержание животных соответствовало правилам лабораторной практики (GLP) и Приказу МЗ СР РФ № 708н от 23.08.2010 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

Иммунизация

Иммунизацию животных осуществляли шприцевым методом, при этом препарат кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции

и контрольное вещество вводили в квадрицепс левой конечности в объеме 500 мкл. После инъекции место введения обрабатывали раствором диоксида хлора (Clidox-S; Pharmacol, Naugatuck, Conn).

Препарат сравнения вводили животным перорально.

В обоих случаях схема иммунизации предусматривала либо однократное, либо двукратное введение иммунобиологических лекарственных препаратов. В последнем случае повторное введение каждого препарата осуществляли спустя 14 суток после первичной иммунизации. Численность каждой группы составляла 10 животных.

Заражение животных и получение материала на исследование

В исследовании был использован штамм EDC ротавируса мышей, депонированный в Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И. Ивановского под номером ГKB М 2113. Спустя 21 сутки после последней иммунизации (однократной или двукратной) животных заражали штаммом EDC ротавируса мышей. В предварительных исследованиях было установлено, что 1 DD₅₀ (death dose) составила 1×10^4 БОЕ (бляшкообразующих единиц). Для заражения была взята в 100 раз превышающая 1 DD₅₀ доза вируса (1×10^6 БОЕ), которую животным вводили перорально в объеме 0,2 мл.

В первые 8 суток поствакцинального периода ежедневно после заражения у животных всех подопытных групп (по 3 животных из группы, которые были помещены в отдельные клетки) производили забор фекалий для последующего определения в них содержания вирусного антигена. Каждый образец фекалий был помещен в 500 мкл буферного раствора Earle (Gibco, Grand Island, N.Y.).

Спустя 8 суток после заражения животных умерщвляли методом декапитации и производили тотальный забор крови от животных каждой группы, индивидуально от каждого животного. Из полученной крови готовили сыворотки, которые были в дальнейшем в качестве субстрата использованы для определения в них уровня общих (IgA, IgM и IgG) и IgG- или IgA-специфичных антиротавирусных антител.

Кроме этого методом ИФА в супернатантах субстратов кишечника подопытных животных определяли уровни ротавируссpezifичных и общих антител IgM, IgG, IgA. Супернатанты получали путем смывов физиологическим раствором содержимого кишечника через прямую кишку.

Выявление ротавирусного антигена методом иммуноферментного анализа

Фекальная суспензия (10 % [вес/объем]) проверялась на наличие ротавирусного антигена. В индивидуальную лунку 96-луночного план-

шета (Costar, Cambridge, Mass.) вносили 100 мкл коровьей антиротавирусной гипериммунной сыворотки в разведении 1:2000 на растворе, содержащем 1,5 мМ карбоната натрия и 3,5 мМ бикарбоната натрия. Планшеты инкубировали во влажной камере при температуре +4 °С. Далее планшеты промывали четыре раза отмывочным буфером, содержащим 1,73 М NaCl, 0,03 М KH₂PO₄, 0,13 М Na₂HPO₄, 0,25 % Tween 20 (Sigma, St. Luis, Mo.), и два раза дистиллированной водой. Затем в каждую лунку вносили 100 мкл 0,5 % желатина (Sigma) и 100 мкл 0,05% Tween 20, планшеты инкубировали при комнатной температуре 1 ч. Лунки четырехкратно промывали отмывочным буфером и дважды дистиллированной водой. В лунки вносили по 50 мкл исследуемого образца фекалий (опыт) либо раствора, содержащего 0,5 % желатин и 0,05 % Tween 20 (контроль). Планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа, после чего лунки промывали отмывочным буфером и дистиллированной водой. Затем в каждую лунку вносили по 100 мкл разведенной 1:2000 кроличьей антиротавирусной гипериммунной сыворотки и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. По истечении инкубации планшеты промывали отмывочным буфером и дистиллированной водой и в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата на основе щелочной фосфатазы и антикроличьих IgG козы (Cappel, Durham, N.C.). После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре планшеты промывали отмывочным буфером и дистиллированной водой и затем в каждую лунку вносили по 100 мкл раствора 1 М диэтиламина и р-нитрофенил фосфата (Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, Md.). Инкубировали при комнатной температуре в течение 90 минут. Результаты регистрировали при длине волны $\lambda = 405$ нм на ИФА ридере (Dynatech). Проба считалась положительной, если оптическая плотность в экспериментальной лунке $> 0,1$ единицы и в 2 раза превышала оптическую плотность в соответствующих контрольных лунках.

Оценка выживаемости животных

Специальная серия исследований, выполненная на 60 мышах, была спланирована с целью оценки влияния иммунизации на выживаемость инфицированных животных. В этом случае животных иммунизировали согласно выбранным схемам. По окончании иммунизации за ними наблюдали в течение трех недель, после чего заражали мышинным ротавирусом перорально в дозе, в 1000 раз превышающей 1 DD₅₀ (1×10^7 БОЕ). За инфицированными животными наблюдали в течение 14 суток, ежедневно отмечая количество живых и погибших особей.

Оцениваемыми показателями служили процент выживших животных в группе и уровень

защиты, представляющий собой разность между показателями выживаемости в группах вакцинированных животных и контрольных группах.

Статистическая обработка результатов исследования

Статистическая обработка результатов выполнена на персональном компьютере при помощи пакета программ для статистической обработки данных STATISTICA for Windows 7.0 (StatSoft, США). К расчетам был принят критический уровень значимости $\alpha = 0,05$. Определяли средние значения исследованных показателей, стандартную ошибку средних показателей. Использованы стандартные методы параметрической и непараметрической статистики. Различия в концентрациях антител оценивали с использованием теста Манна–Уитни U. Сравнение результатов по Р критерию $< 0,05$ проводили только в тех случаях, когда были выявлены ощутимые различия в величинах оцененных показателей.

Результаты

Оценка способности вакцинных препаратов индуцировать защиту против заражения мышинным ротавирусом EDC

Оценка способности вакцинных препаратов индуцировать защиту против заражения мышинным ротавирусом EDC показала их эффективность в данном аспекте (рис. 1).

Как следует из представленных данных, у контрольных животных (отрицательный контроль) в фекалиях достаточно интенсивно выявлялся ротавирусный антиген, причем заметных отличий в зависимости от кратности введения им физиологического раствора не выявлено. На этом фоне применение коммерческого препарата вне зависимости от схемы иммунизации оказалось достаточно эффективным и практически полностью предупреждало размножение ротавируса в организме животных. В обоих случаях количество выявляемого ротавируса в фекалиях < 10 нг/мл, то есть практически в 50–60 раз меньше, чем в контроле ($p < 0,001$). Оцениваемая кандидатная вакцина в этом плане не сильно уступала коммерческой, особенно в случае ее двукратного применения с интервалом 14 суток. При этом количество определяемого ротавирусного антигена в фекалиях < 10 нг/мл. Под влиянием кандидатной вакцины при ее однократном применении количество определяемого ротавирусного антигена в фекалиях составило 195 нг/мл, то есть при таком типе введения данная вакцина оказалась менее активной, что, возможно, связано с особенностями формирования иммунного ответа на сорбированные антигены.

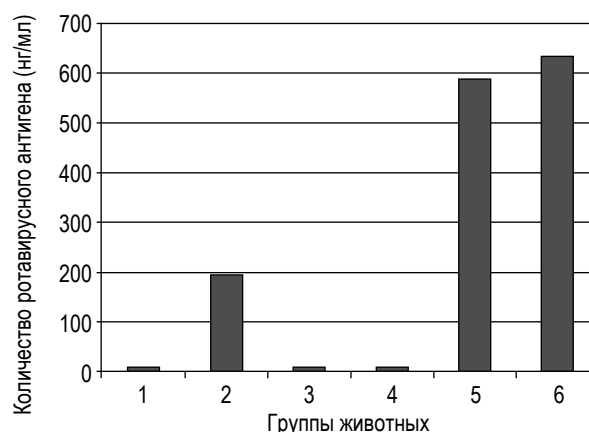


Рисунок 1. Диаграмма общего количества ротавирусного антигена в фекалиях мышей, отобранных в течение первых 7 суток после заражения мышинным ротавирусом EDC

Примечание. Группа 1 – животные, иммунизированные кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, внутримышечно, двукратно с интервалом 14 суток. Группа 2 – животные, иммунизированные кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, внутримышечно, однократно. Группа 3 – животные, иммунизированные вакциной Rotarix® (Glaxo Smith Kline), перорально, двукратно с интервалом 14 суток. Группа 4 – животные, иммунизированные вакциной Rotarix® (Glaxo Smith Kline), перорально, однократно. Группа 5 – животные, иммунизированные физиологическим раствором (отрицательный контроль), двукратно, внутримышечно. Группа 6 – животные, иммунизированные физиологическим раствором (отрицательный контроль), однократно, внутримышечно.

Оценка выживаемости животных

Для оценки выживаемости животных иммунизировали согласно выбранным схемам. Полученные результаты приведены на рисунке 2 (рис. 2).

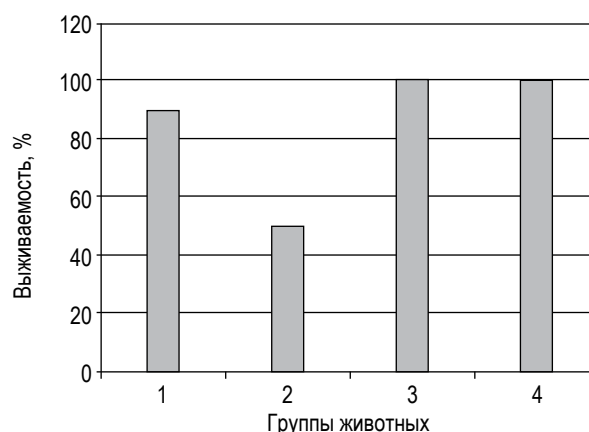


Рисунок 2. Диаграмма защитной эффективности ротавирусных вакцин различной природы в отношении экспериментальной инфекции, вызванной мышинным ротавирусом EDC

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

Как следует из представленных выше данных, иммунизация вакцинами против ротавирусной инфекции обеспечивает надежный уровень защиты животных от заражения мышинным ротавирусом. Коммерческий препарат в 100% случаев препятствовал гибели животных как при однократном, так и двукратном применении. Кандидатная вакцина на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 также оказалась весьма эффективной – в случае двукратного применения вакцина обеспечивала защиту 90% инфицированных мышей, в случае однократного применения – 50% животных.

Оценка уровня ротавируспецифичных антител IgA и IgG в сыворотках крови и содержимом кишечника

Результаты оценки уровня ротавируспецифичных антител IgA и IgG в сыворотке крови приведены на рисунке 3 (рис. 3).

Как видно из приведенных данных, при введении кандидатной вакцины на основе рекомбинантного белка FliCVP6VP8 в сыворотке крови наблюдается формирование уровня ротавируспецифичных антител, как IgA, так и IgG, сопоставимого с уровнем, наблюдаемым при введении коммерческого препарата – живой вакцины против ротавирусной инфекции Rotarix. Так, при двукратной иммунизации кандидатной вакциной доля ротавируспецифичных IgA от общего количества IgA антител составила 18,82%, по сравнению с 18,36%, выявленной при двукратном введении коммерческой вакцины. Аналогично выявили долю ротавируспецифичных IgG антител от общего количества IgG в размере 5,93% против 5,64% в случае двукратного введения коммерческой вакцины. Доля ротавируспецифичных от общего количества антител у животных, получавших физиологический раствор, составила менее 0,01% в случае IgA и менее 1% в случае IgG. Следует отметить, что доля ротавируспецифичных IgA несколько выше при двукратной иммунизации кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, тогда как доля ротавируспецифичных IgG при обеих схемах иммунизации практически не имеет различий.

Данные по продукции вирусспецифичных IgA и IgG в смывах кишечника животных, иммунизированных кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции, представлены ниже (рис. 4).

Как видно из приведенных данных, при введении кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции в содержимом кишечника наблюдается уровень ротавируспецифичных антител IgG, сопоставимый с уровнем, наблюдаемым при введении коммерческого препарата – живой вакцины против ротавирусной инфекции Rotarix, при

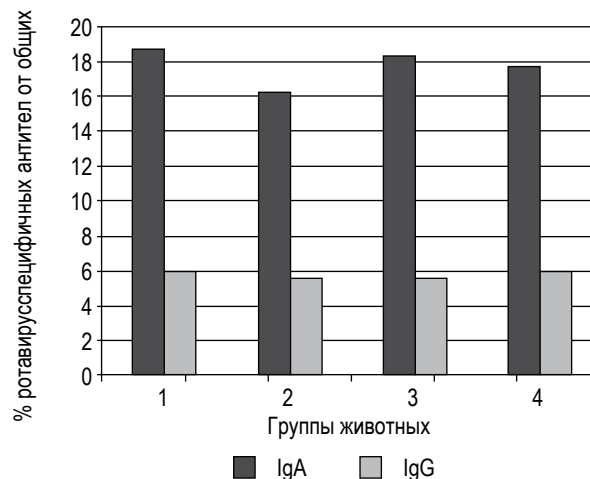


Рисунок 3. Диаграмма относительного количества продуцируемых ротавируспецифичных антител IgA и IgG в сыворотке крови в зависимости от схемы иммунизации

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

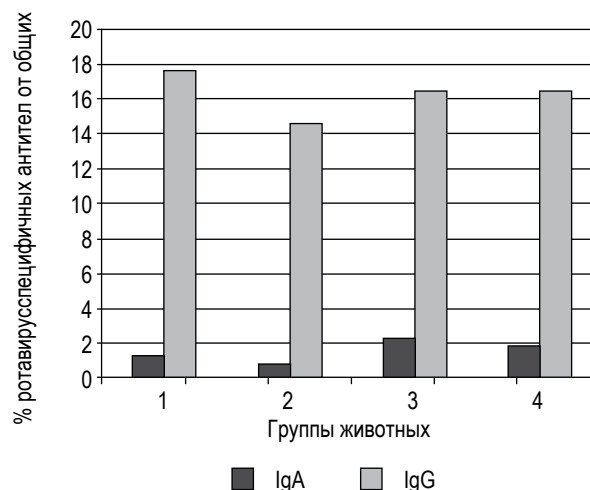


Рисунок 4. Диаграмма относительного количества продуцируемых ротавируспецифичных антител IgA и IgG в смывах кишечника в зависимости от схемы иммунизации

Примечание. См. примечание к рисунку 1.

этом уровень IgA несколько уступает при иммунизации кандидатной вакциной по сравнению с коммерческим препаратом. Так, при двукратной иммунизации кандидатной вакциной доля ротавируспецифичных IgA от общего количества IgA антител составила 1,30%, по сравнению с 2,30%, выявленной при двукратном введении коммерческой вакцины. Аналогично выявили долю ротавируспецифичных IgG антител от общего количества IgG в размере 17,68% против 16,50% в случае двукратного введения коммерческой вакцины. Доля ротавируспецифичных

от общего количества антител у животных, получавших физиологический раствор, составила менее 0,01% в случае IgA- и IgG-антител. Следует отметить, что доля ротавируспецифичных IgA и IgG при двукратном введении кандидатной вакцины несколько выше, нежели при ее однократном применении (1,30% против 0,86% и 17,68% против 14,60% соответственно).

Обсуждение

По результатам проведенных исследований протективности разработанную кандидатную вакцину на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 можно охарактеризовать как эффективную в плане защиты от ротавирусной инфекции при ее внутримышечном введении в организм. Оценка способности кандидатной вакцины индуцировать защиту против заражения мышинным ротавирусом EDC показала ее эффективность в данном аспекте. Животные, дважды иммунизированные вакциной на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 и впоследствии зараженные ротавирусом EDC, характеризовались уровнем определяемого ротавирусного антигена в фекалиях < 10 нг/мл, так же как и животные, иммунизированные коммерческой вакциной. Полная защита от мышинного ротавируса после его перорального введения иммунизированным кандидатной вакциной против ротавирусной инфекции животным ассоциировалась с продукцией вирусспецифичных IgA в кишечнике животных и в сыворотке крови, а также вирусспецифичных IgG в этих же биосубстратах. При двукратном применении кандидатная вакцина эффективнее, нежели в случае ее однократного введения, что можно объяснить особенностями формирования иммунного ответа к сорбированным на гидроксиде алюминия антигенам.

В настоящее время на мировом рынке доступны вакцины на основе живого аттенуированного штамма ротавируса. Применение данных вакцин связано с риском возникновения тяжелого побочного эффекта — инвагинации кишечника, который был зарегистрирован при применении первой лицензированной вакцины RotaShield, отозванной вскоре после регистрации [6]. В силу

того, что разрабатываемая кандидатная вакцина не содержит живого компонента в своем составе, ее использование не связано с увеличением риска возникновения данного патологического состояния. Эффективность кандидатной вакцины против ротавирусной инфекции на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 сопоставима с таковой коммерческой вакцины Rotarix® (Glaxo Smith Kline) при большей безопасности кандидатной вакцины, за счет отсутствия живого вируса в ее составе.

Результаты исследований различных групп ученых показали, что VP6-специфичные антитела имеют прямую противоротавирусную активность. Нейтрализующая активность проявляется за счет ингибирования процесса репликации вирусов [7, 8]. Совместные исследования финских и мексиканских ученых показали, что иммунизация лабораторных мышей кандидатной противоротавирусной вакциной, активным агентом которой является капсидный белок ротавируса VP6, вызывает формирование протективного иммунного ответа против последующего заражения животных штаммом мышинного ротавируса EDIM [9]. Полученные авторами результаты согласуются с результатами, полученными в данной работе — наблюдается формирование нейтрализующих IgG- и IgA-антител как в сыворотке крови, так и на слизистой кишечника, также существенно снижается выделение ротавирусного антигена с фекалиями иммунизированных животных по сравнению с неиммунизированным контролем после заражения штаммом мышинного ротавируса EDIM. Следует заметить, что кандидатная противоротавирусная вакцина на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8 имеет ряд преимуществ по сравнению с вакциной на основе полноразмерного ротавирусного белка VP6. Использование антигенных эпитопов позволяет создать более активный и универсальный иммуноген, обеспечивающий перекрестную защиту против различных штаммов ротавируса.

Таким образом, полученные результаты говорят о целесообразности проведения дальнейших доклинических испытаний кандидатной противоротавирусной вакцины на основе рекомбинантного белка FLiCVP6VP8.

Список литературы / References

1. Духовлинов И.В., Богомолова Е.Г., Федорова Е.А. Создание гибридных рекомбинантных белков на основе VP6 и VP8 ротавируса человека группы А // *Инфекция и иммунитет*, 2014. Т. 4. С. 229-234. [Dukhovlinov I.V., Bogomolova E.G., Fedorova E.A., Simbirtsev A.S. Development of fusion recombinant proteins based on VP6 and VP8 of human rotavirus A. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2014, Vol. 4, no. 3, pp. 229-234. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2014-3-229-234>.

2. Bishop R.F., Davidson G.P., Holmes I.H., Ruck B.J.. Virus particles in epithelial cells of duodenal mucosa from children with acute non-bacterial gastroenteritis. *Lancet*, 1973, Vol. 2, pp. 1281-1283.
3. Schnagl R.D., Holmes I.H. Characteristics of the genome of human infantile enteritis virus (Rotavirus). *Journal of Virology*, 1976, Vol. 19, no. 1, pp. 267-270.
4. Gil M.T., de Souza C.O., Asensi M., Buesa J. Homotypic protection against rotavirus-induced diarrhea in infant mice breast-fed by dams immunized with the recombinant VP8* subunit of the VP4 capsid protein. *Viral Immunol.*, 2000, Vol. 13, no. 2, pp. 187-200.
5. Balaram P., Kien P.K., Ismail A. Toll-like receptors and cytokines in immune responses to persistent mycobacterial and Salmonella infections. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2009, Vol. 299, no. 3, pp. 177-185.
6. Anderson E.J. Time to Begin a New Chapter and Expand Rotavirus Immunization. *Clin. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 59, no. 7, pp. 982-986.
7. Lee S., Belitsky B.R., Brinker J.P., Kerstein K.O., Brown D.W., Clements J.D., Keusch G.T., Tzipori S., Sonenshein A.L., Herrmann J.E. Development of a Bacillus subtilis-based rotavirus vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, Vol. 17, pp. 1647-1655.
8. Aiyegbo M.S., Sapparapu G., Spiller B.W., Eli I.M., Williams D.R., Kim R., Lee D.E., Liu T., Li S., Woods V.L. Jr. et al. Human rotavirus VP6-specific antibodies mediate intracellular neutralization by binding to a quaternary structure in the transcriptional pore. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, p. 61101.
9. Lappalainen S., Pastor A.R., Tamminen K., López-Guerrero V., Esquivel-Guadarrama F., Palomares L.A., Vesikari T., Blazevic V. Immune responses elicited against rotavirus middle layer protein VP6 inhibit viral replication *in vitro* and *in vivo*. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 2014, Vol. 10, no. 7, pp. 2039-2047.

Авторы:

Духовлинов И.В. — к.б.н., начальник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Богомолова Е.Г. — младший научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Федорова Е.А. — научный сотрудник лаборатории генетической инженерии вакцин ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Симбирцев А.С. — д.м.н., профессор, директор ФГУП «Государственный научно-исследовательский институт особо чистых биопрепаратов» ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Dukhovlinov I.V., PhD (Biology), Head, Laboratory for Genetically Engineered Vaccines, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Bogomolova E.G., Junior Research Associate, Laboratory for Genetically Engineered Vaccines, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Fedorova E.A., Research Associate, Laboratory for Genetically Engineered Vaccines, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Simbirtsev A.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, State Research Institute of Highly Pure Biopreparations, Federal Agency for Medicine and Biology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 16.06.2016
Отправлена на доработку 20.06.2016
Принята к печати 06.07.2016

Received 16.06.2016
Revision received 20.06.2016
Accepted 06.07.2016

РЕЗУЛЬТАТЫ ПИЛОТНОГО КЛИНИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ВАКЦИН НА ОСНОВЕ ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК В ЛЕЧЕНИИ РЕЦИДИВИРУЮЩЕЙ ГЕРПЕСВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ

Леплина О.Ю., Старостина Н.М., Блинова Д.Д., Желтова О.И.,
Олейник Е.А., Тыринова Т.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

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

Резюме. Хроническое рецидивирующее течение инфекции, обусловленной вирусами простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типа, представляет серьезную медико-социальную проблему. Учитывая важную роль иммунной системы в контроле за вирусом, перспективы лечения рецидивирующих форм ВПГ-инфекции связывают с активацией антигенспецифического иммунного ответа, в частности с использованием вакцин на основе дендритных клеток (ДК). В настоящей работе представлены результаты открытого пилотного исследования эффективности и безопасности дендритноклеточных вакцин у пациентов с рецидивирующей ВПГ-инфекцией. В исследование были включены 29 человек, включая 14 пациентов с лабиальным и 15 с генитальным герпесом. ДК генерировали в присутствии GM-CSF и IFN α , нагружали рекомбинантными вирусными белками (HSV1gD или HSV-2gD) и проводили 2 курса вакцинаций в течение 9 мес. Иммунотерапия ДК не вызывала серьезных нежелательных эффектов и сопровождалась более чем двукратным снижением частоты рецидивов и увеличением длительности ремиссии на фоне 9 мес. лечения. В период последующего 6-месячного периода наблюдалось дальнейшее снижение частоты рецидивов и трехкратное возрастание длительности ремиссии. Клинический эффект на фоне лечения и в период 6 мес. наблюдения отмечался как в группе с лабиальным, так и генитальным герпесом, регистрировался у большинства пациентов, ассоциировался с индукцией антигенспецифического пролиферативного ответа и нормализацией исходно сниженной митогенной реактивности мононуклеарных клеток в ответ на стимуляцию КонА. Анализ отдаленных результатов лечения на основе анкетирования пациентов с давностью наблюдения более 24 мес. показал, что положительный эффект иммунотерапии в виде снижения частоты рецидивов через 48 мес. (медиана наблюдения) сохранялся у 77,8% опрошенных. Антигенспецифический пролиферативный ответ в эти сроки сохранялся у 66,7%. Полученные результаты позволяют рассматривать ДК-вакцины в качестве нового перспективного подхода к лечению рецидивирующих форм лабиального и генитального герпеса.

Ключевые слова: пилотное исследование, герпес, дендритные клетки, лечебные вакцины

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Leplina Olga Yu.
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: oleplina@mail.ru; ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

О.Ю. Леплина, Н.М. Старостина, Д.Д. Блинова,
О.И. Желтова, Е.А. Олейник, Т.В. Тыринова,
А.А. Останин, Е.Р. Черных «Результаты пилотного
клинического исследования вакцин на основе
дендритных клеток в лечении рецидивирующей
герпесвирусной инфекции» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 425-436.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-425-436

© Леплина О.Ю. и соавт., 2016

For citation:

O.Yu. Leplina, N.M. Starostina, D.D. Blinova,
O.I. Zhebtova, E.A. Oleinik, T.V. Tyrinova, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh "Results of a pilot clinical trial of dendritic-cell
based vaccines for treatment of recurrent herpesvirus infection",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 5, pp. 425-436.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-425-436

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-425-436>

RESULTS OF A PILOT CLINICAL TRIAL OF DENDRITIC-CELL BASED VACCINES FOR TREATMENT OF RECURRENT HERPESVIRUS INFECTION

Leplina O.Yu., Starostina N.M., Blinova D.D., Zheltova O.I.,
Oleinik E.A., Tyrinova T.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

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

Abstract. Chronic recurrent infections caused by herpes simplex virus (HSV) types 1 and 2 represent a serious medical and social challenge. Given an important role of immune system in surveillance of viral infections, an induced enhancement of antigen-specific immune response seems to be a promising approach to treatment of recurrent HSV infections, in particular, using dendritic cell (DCs) vaccines. The present paper contains results of an open pilot study evaluating efficacy and safety of dendritic-cell vaccines in the patients with recurrent HSV infections. Twenty-nine patients including 14 persons with labial herpes, and 15, with genital herpes have been enrolled in this study. DCs were generated in presence of GM-CSF and IFN α and then loaded with recombinant viral proteins (HSV1gD or HSV2gD). These cells were applied in 2 rounds of vaccination performed within 9 months. Immunotherapy with DCs did not induce sufficient side effects, and was accompanied by more than two-fold decrease in relapse rate and increased length of remissions during the 9-month period of treatment. Later on, we revealed a reduced frequency of relapses, and a 3-fold increase in remission duration over the subsequent 6-month follow up. The clinical effect during the treatment and at later terms (a half-year observation) was noted with both labial and genital herpes, as registered in the majority of patients, being associated with induction of antigen-specific proliferative response and normalization of reduced mitogenic responsiveness of mononuclear cells towards ConA. The patients' survey at longer terms (more than 24 months) has shown that the beneficial effect of immunotherapy, in terms of reduced relapse rates, was maintained in 77.8% of the respondents by 48 months (a median follow-up term). At this time, the antigen specific proliferative response was maintained in 66.7% of patients. The data obtained suggest that the dendritic-cell vaccines may be a promising approach to the treatment of recurrent labial and genital herpes.

Keywords: *pilot study; herpesvirus infection; dendritic cells; therapeutic vaccines*

Введение

Вирус простого герпеса (ВПГ) 1 и 2 типа представляет одну из наиболее распространенных инфекций у человека с поражением кожи и слизистых оболочек. ВПГ 1 типа вызывает преимущественно орофациальные повреждения, тогда как ВПГ 2 типа ассоциирован с генитальным герпесом. Инфицированность населения планеты герпесом, по данным ВОЗ, достигает 65-90%. Первичная ВПГ-инфекция характеризуется слабовыраженными клиническими проявлениями, заканчивается самостоятельным выздоровлением и контролируется с участием клеточных и гуморальных реакций врожденного и приобретенного иммунитета, среди которых ведущая роль отводится факторам врожденного иммунитета — макрофагам, интерферонам и естественным киллерным клеткам [37]. Характерно, что полной элиминации вируса при этом не происходит, и ВПГ пожизненно персистирует в организме. При этом дефект или ослабление иммунологического контроля может приводить к генерализации инфекции или развитию рецидивирующих

форм [6, 32]. Хроническое рецидивирующее течение регистрируется у 10-25% населения и представляет серьезную медико-социальную проблему в связи со снижением трудоспособности, развитием нарушений репродуктивной функции (при генитальном герпесе) и психоэмоциональных расстройств, а также снижением качества жизни.

Экспериментальные и клинические исследования показали, что предупреждение рецидива обеспечивается активацией Th1-ответа и клеток врожденного иммунитета. Th1-цитокины активируют цитотоксическую функцию естественных киллерных клеток и поддерживают генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ), обеспечивающих элиминацию вируса [6, 35, 41, 43]. Поэтому реактивацию вируса и рецидив инфекции связывают в первую очередь с дефектом клеточного иммунитета. Действительно, у пациентов с рецидивирующими формами ВПГ-инфекции выявляется угнетение продукции Th1-цитокinov, повышенный уровень Th2-цитокinov и возрастание регуляторных Т-клеток [2, 27, 28, 36].

Основным подходом к лечению рецидивирующей ВПГ-инфекции является противовирусная терапия ациклическими нуклеозидами. Пролонгированная химиотерапия снижает частоту обострений при лабиальной и генитальной формах инфекции в период лечения [1, 5, 14, 24, 31]. Тем не менее, данные метаанализа свидетельствуют, что клиническая эффективность длительного перорального применения противовирусных препаратов в лечении ВПГ-1 инфекции остается низкой [13], а уровень доказательности эффекта супрессивной противовирусной терапии при генитальном герпесе — недостаточно убедительным [23]. Кроме того, продолжительная противовирусная химиотерапия является дорогостоящей и не гарантирует прекращения рецидивов после завершения лечения.

Альтернативный подход связан с активацией иммунного контроля за вирусной инфекцией. Вирусные оболочечные гликопротеины gD и gB и входящие в их состав пептиды являются высокоиммуногенными, активируют CD4 и CD8 Т-клетки, и презентация их дендритными клетками является ключевым моментом запуска противовирусного иммунного ответа [6, 9, 10]. Субъединичная вакцина против ВПГ-2 на основе гликопротеина D оболочки вириона (gD) в комбинации с Th1-адьювантом показала эффективность в профилактике или снижении частоты рецидивов в модели ВПГ-2 индуцированной инфекции у морских свинок [12]. Эта вакцина также продемонстрировала эффективность в профилактике генитального герпеса, обусловленного ВПГ-1 у ВПГ-1 и ВПГ-2 серонегативных женщин [38], и была разрешена к применению в Западной Европе. Однако лечебные вакцины для лечения рецидивирующих форм лабиального и генитального герпеса до настоящего времени отсутствуют.

Недавние исследования показали, что запуск антигенспецифического Th1 ответа и генерация цитотоксических Т-лимфоцитов индуцируются дендритными клетками (ДК), которые презентуют антигены и активируют наивные Т-лимфоциты в региональных лимфоузлах [7, 25]. ВПГ-инфекция оказывает существенное влияние на функции ДК, в частности подавляет их созревание, продукцию IL-12 и аллостимуляторную активность, а также индуцирует апоптоз ДК [8, 21, 29]. Соответственно, использование генерируемых *ex vivo* полноценных ДК, нагруженных антигенами вирусов ВПГ 1 и 2 типа, рассматривается в качестве новой стратегии профилактики и лечения рецидивирующей ВПГ-инфекции.

Действительно, доклинические исследования на экспериментальных животных показали безопасность и эффективность ДК-вакцин при ВПГ-

инфекции. Так, Schön E. с соавт. показали высокую эффективность ДК-вакцин, нагруженных антигеном вируса герпеса 2 типа в защите мышей от гибели при инфицировании ВПГ 2 типа [34]. В свою очередь, Ghasemi M. с соавт. показали, что вакцинация мышей ДК, нагруженными антигенами ВПГ-1 полностью предотвращала летальный исход и развитие латентной ВПГ-1 инфекции [19]. В первом случае авторы использовали в качестве антигена инактивированный ультрафиолетовым облучением вирус ВПГ-2 или очищенные оболочечные гликопротеины, во втором — частично очищенный вирусный белок, содержащий все 4 основных гликопротеина — В, С, D и Е.

Клинические исследования ДК-вакцин при ВПГ-инфекции не проводились. Тем не менее, ранее было показано, что введение волонтерам ДК, нагруженных антигенами вируса гриппа, характеризуется хорошей переносимостью и безопасностью и индуцирует продолжительный клеточный и гуморальный иммунный ответ [16]. Кроме того, безопасность ДК в качестве клеточного адьюванта при разработке противовирусных вакцин была продемонстрирована у пациентов с хроническими вирусными гепатитами В и С, а также ВИЧ-инфекцией [18, 26, 42].

Ранее нами были опубликованы результаты промежуточного анализа открытого пилотного клинического исследования ДК-вакцин у больных с рецидивирующими формами ВПГ-инфекции, которые показали хорошую переносимость и безопасность ДК вакцин в процессе лечения и последующего 6-месячного наблюдения [3]. Настоящая работа посвящена исследованию клинической эффективности ДК-вакцин и их безопасности в большей группе пациентов с рецидивирующей ВПГ-инфекцией и анализу не только ближайших, но и отдаленных эффектов иммунотерапии.

В качестве клеточной платформы использовались ДК, генерированные из моноцитов в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) и интерферона- α (IFN-ДК). По сравнению с традиционно генерируемыми ДК, которые получают в присутствии GM-CSF и интерлейкина-4 [40], IFN-ДК характеризуются более высокой миграционной активностью, более эффективно стимулируют пролиферацию цитотоксических Т-клеток, обладают способностью активировать как Th1-, так и Th2-ответ и способны продуцировать IFN α [15, 22, 33].

Материалы и методы

Рекрутирование, обследование и лечение пациентов осуществлялось в период с мая 2008 по декабрь 2014 на базе клиники иммунопатоло-

гии Института фундаментальной и клинической иммунологии. Клинические испытания проводились в дизайне открытого проспективного пилотного исследования с контролем «до-после» согласно протоколу, утвержденному на заседании Ученого Совета (протокол № 9 от 11 декабря 2007 г.) и одобренному локальным этическим комитетом. Все манипуляции по получению и культивированию клеток проводили в условиях специализированной лаборатории на основе лицензий на трансплантацию костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток (ФС-54-01-002049) и применение клеточных технологий (ФС-54-01-001780).

В исследование включались больные в возрасте от 18 до 60 лет обоего пола после подписания письменного информированного согласия. Критериями включения служили: наличие рецидивирующей ВПГ-инфекции с частыми рецидивами (для лабиального герпеса — более 6 раз в год, для генитального герпеса — более 4 раз в год); резистентное течение заболевания при использовании противовирусных препаратов в период обострения; отказ от проведения продолжительных курсов супрессивной противовирусной терапии, согласие пациентов на воздержание от самостоятельного приема коротких курсов противовирусных препаратов во время проведения клинического исследования; состояние ремиссии (минимум 2 недели после последнего рецидива) на момент начала терапии.

Критериями исключения являлись: несоответствие критериям включения, наличие выраженной иммунокомпроментации, обусловленной иммуносупрессивной терапией или сопутствующей ВИЧ-инфекцией; прием противовирусных препаратов на протяжении 4 недель перед началом клинического исследования или во время его проведения; участие пациента в другом клиническом исследовании; выраженная хроническая декомпенсированная сердечно-сосудистая, дыхательная, печеночная, почечная недостаточность, декомпенсированный сахарный диабет; злокачественные заболевания; болезни крови; психические нарушения; беременность.

В качестве первичной конечной точки оценивали клиническую эффективность по изменению количества рецидивов/продолжительности межрецидивного периода в течение 9-месячного периода лечения по сравнению с соответствующими показателями до начала терапии (рассчитанными с учетом числа обострений за последний год перед рекрутированием). Активное наблюдение за пациентами осуществлялось путем телефонных или e-mail опросов, проводимых 1 раз в месяц. Поскольку сроки наблюдения в эти периоды различались и составляли соответственно:

до терапии — 12 мес., на фоне терапии — 9 мес., для сравнения частоты обострений использовались условные показатели, отражающие количество рецидивов в пересчете на 1 мес., т.е. рассчитанные как отношение количества рецидивов к числу месяцев наблюдения. Наряду с этим были рассчитаны средние показатели межрецидивного периода как отношение длительности периода наблюдения (в днях) к количеству обострений за данный срок.

Вторичными точками являлись: 1) оценка переносимости и безопасности по развитию местных и общих нежелательных реакций; 2) оценка количества рецидивов/продолжительности межрецидивного периода в течение 6-месячного периода наблюдения после завершения иммунотерапии по сравнению с соответствующими показателями до начала терапии; 3) оценка эффективности терапии по данным анкетирования пациентов с давностью наблюдения более 24 мес. Анкета включала 4 вопроса: а) отмечаете ли Вы улучшение после проведенного лечения (снижение частоты рецидивов, сокращение продолжительности рецидивов, уменьшение площади высыпаний); б) отмечаете ли Вы улучшение общего самочувствия после проведенного лечения (более благоприятное протекание периодов обострения с меньшей выраженностью симптомов интоксикации, как то: озноб, лихорадка, слабость, головная боль, боль в мышцах); в) не было ли ухудшения (учащение рецидивов, обострение хронических заболеваний) в период после завершения терапии; г) не жалеете ли Вы, что приняли участие в клиническом исследовании; 5) оценка иммуннокорректирующего эффекта терапии по интенсивности антигенспецифической и митоген-индуцированной пролиферативной активности Т-клеток.

Обследование пациентов проводилось — до начала лечения; после окончания 2-х курсов иммунотерапии (через 9 мес.) и последующего 6-месячного срока наблюдения после завершения вакцинаций (через 15 мес.). Анкетирование всех пациентов со сроком наблюдения более 24 мес. проводилось одномоментно. Давность от начала терапии до момента проведения анкетирования составляла в среднем 48 мес.

Для получения ДК из периферической крови выделяли мононуклеарные клетки (МНК) центрифугированием в градиенте плотности фиколла-верографина. Фракцию прилипающих к пластику МНК культивировали в пластиковых флаконах для культивирования (BD Biosciences Falcon, UK) в течение 3 сут. в среде RPMI-1640 (Sigma, США) в присутствии GM-CSF (Sigma, США) 40 нг/мл и IFN α 1000 ЕД/мл (Роферон-А, Roche, Швейцария). ДК нагружа-

ли рекомбинантным гликопротеином D (gD). Для этого генерируемые ДК инкубировали в течение 1 ч с рекомбинантным HSV1gD, а ДК пациентов с генитальным герпесом — HSV1gD или HSV-2gD (ProSpec, Israel) в зависимости от типа вируса в дозе 5 мкг/мл. Нагруженные антигеном ДК индуцировали к созреванию путем 24-часового культивирования с азоксимер бромидом (Петровас) в дозе 2 нг/мл. Данное соединение является водорастворимым катионным полимером [20], представляющим адьюванты DAMP-типа, которые активируют провоспалительные сигнальные пути и усиливают антигенную презентацию и созревание эффекторных клеток [17, 30].

После дозревания клетки отмывали, аликвотировали по 5×10^6 /пробирку, криоконсервировали и хранили в морозильной камере (SanyoUltraLow) при -80°C до последующего использования. Качество ДК вакцин оценивали по чистоте генерируемых ДК с учетом экспрессии линейных маркеров, HLA-DR и CD86 методом проточной цитофлуориметрии. Для этого ДК инкубировали с анти-HLA-DR и анти-CD86 мАТ (BectonDickinson) и исследовали на лазерном клеточном сортире-анализаторе FACSCalibur (BectonDickinson, США) с использованием программы CellQuest (BectonDickinson, США). Полученные ДК содержали не менее 70% HLA-DR⁺, Lin⁻ (CD3⁺, CD20⁺, CD56⁺) клеток, среди которых доля CD86⁺ составляла 50% и более. Стерильность и жизнеспособность (на основе окрашивания препаратов трипановым синим) оценивали перед каждым введением клеток. Жизнеспособность размороженных ДК составляла во всех случаях более 85%.

Лечение включало два курса антигенспецифической терапии. Первый курс состоял из 4-6 подкожных инъекций ДК (5×10^6 клеток), нагруженных рекомбинантным HSV-1gD или HSV-2gD с 2-недельным интервалом (общей продолжительностью 3 мес.). Второй курс проводился после завершения первого и состоял из 4-6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц (общей продолжительностью 6 мес.). В качестве адьюванта использовали рекомбинантный интерлейкин-2 (Ронколейкин, ООО НПК «Биотех» Санкт-Петербург), который вводили подкожно в дозе 250 000 ЕД. Вакцинации проводили подкожно в межлопаточную область в 4 точки, интерлейкин-2 вводили аналогичным образом в 4 точки рядом с местом введения вакцины.

Интенсивность антигенспецифического клеточного ответа оценивали в 5-суточных культурах по уровню пролиферации МНК больных в ответ на стимуляцию HSV-1gD либо HSV-2gD антигеном (5 мг/мл) в зависимости от типа инфекции. Неспецифический ответ оценивали в 3-суточных

культурах по уровню пролиферации МНК в ответ на стимуляцию конканавалином А (15 мкг/мл; Sigma, USA). Пролиферативный ответ оценивали радиометрически по включению H^3 тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мккю/лунку.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для оценки достоверности различий сравниваемых выборок использовали непараметрические критерии: Манна-Уитни (для несвязанных выборок) и Вилкоксона (для связанных выборок). Различия считались достоверными при уровне значимости $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (r_s).

Результаты

Исследуемую группу составили 29 пациентов (21 женщина и 8 мужчин) в возрасте от 22 до 49 с лабиальной (14 пациентов) и генитальной (15 пациентов) локализацией герпесвирусной инфекции (табл. 1). Генитальный герпес подтверждался методом ПЦР и у 12 пациентов был обусловлен ВПГ-2, а у 3-х пациентов — ВПГ 1 типа. Давность заболевания составляла в среднем 9 лет, варьируя от 2 до 25 лет. Количество обострений за последний год составляло 12 — с диапазоном

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ПАЦИЕНТОВ

Параметры	Группы пациентов		
	Общая группа	Лабиальный герпес	Генитальный герпес
Количество пациентов (n)	29	14	15
Возраст, лет (Me; $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	30,5 (25-34)	28,5 (24-34)	31,0 (28-36)
Пол (М/Ж)	8/21	4/10	4/11
Давность заболевания, лет (Me; $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	9 (5-15)	15 (10-19)	5 (5-8)**
Число обострений до лечения* (Me; $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	12,0 (10-18)	10,5 (10-12)	12,0 (12-18)
Длительность межрецидивного периода до лечения, дни (Me; $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)	30,3 (20-36)	34,5 (30-36)	31,0 (20-30)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (Me; $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$);

* — на протяжении последнего года до включения в исследование; ** — $p_0 < 0,01$; достоверность различий показателей между группами с лабиальным и генитальным герпесом, U-критерий Манна-Уитни.

от 7 до 25 эпизодов в год. Соответственно, длительность межрецидивного периода до лечения варьировала от 14 до 52 дней и в среднем не превышала 30 дней. Группы пациентов с лабиальным и генитальным герпесом были схожи по возрасту, соотношению мужчин и женщин, количеству обострений, но различались по давности заболевания, которая была значимо выше в группе с лабиальным герпесом.

Иммунотерапия ДК, нагруженными HSV-1gD или HSV-2gD, характеризовалась хорошей переносимостью. Ни у одного из пациентов лечение не было прекращено в связи с развитием серьезных нежелательных явлений, включая обострение хронических заболеваний и ситуаций, требующих госпитализации пациента. Введение ДК-вакцин не влияло на показатели крови и не вызывало токсических реакций со стороны различных органов. Местные поствакцинальные реакции в виде покраснения, припухлости и болезненности в месте введения вакцины регистрировались, соответственно, в 62-82,7% случаев (табл. 2). Общие реакции в виде слабости, озноба, субфебрильной лихорадки, головной боли и недомогания отмечались в 20-55% случаев. Поствакцинальные реакции купировались самостоятельно в течение 24-48 ч.

Для оценки клинической эффективности ДК вакцин был проведен сравнительный анализ частоты рецидивов до терапии, на фоне лечения и после ее завершения. Учитывая различные сроки наблюдения до начала терапии (12 мес.), на фоне терапии (9 мес.) и после терапии (6 мес.) при сравнительном анализе использовали показатели, отражающие количество рецидивов за 1 месяц. В общей группе число обострений на фоне терапии в пересчете на 1 мес. снизилось в 2 раза (рис. 1А). В период наблюдения после терапии рецидивы выявлялись еще реже, и их количество

было в 3 раза ниже, чем до лечения. Характерно, что снижение частоты рецидивов на фоне и после завершения иммунотерапии наблюдалось как у пациентов с лабиальной, так и генитальной формой герпеса и было выражено в одинаковой степени.

Уменьшение числа рецидивов сопровождалось закономерным возрастанием межрецидивного периода. В общей группе данный показатель увеличивался от 30 до 68 дней на фоне терапии и до 90 дней в период 6-месячного наблюдения после терапии (рис. 1Б). При этом различий в динамике возрастания межрецидивного периода в группах с лабиальным и генитальным герпесом не выявлялось.

При анализе индивидуальных значений позитивный клинический ответ в виде снижения частоты рецидивов на фоне лечения в целом по группе составил 86% (25 из 29 человек) и регистрировался у всех 14 пациентов с лабиальным герпесом и 11 из 15 пациентов с генитальным герпесом. Снижение частоты рецидивов в период 6-месячного наблюдения после терапии регистрировалось в общей группе у 22 из 29 (75,9%) пациентов, в том числе 10 из 14 (71,4%) пациентов с лабиальным герпесом и 12 из 15 (80%) пациентов с генитальной формой инфекции. Полное прекращение обострений на фоне лечения наблюдалось только при лабиальном герпесе и регистрировалось у 3 из 14 (21,4%) пациентов. В период 6-месячного наблюдения отсутствие обострений было зарегистрировано также только у 3 из 14 пациентов с лабиальным герпесом, в том числе 1-го пациента с отсутствием обострений во время лечения и у 2-х пациентов, имевших обострения в период терапии.

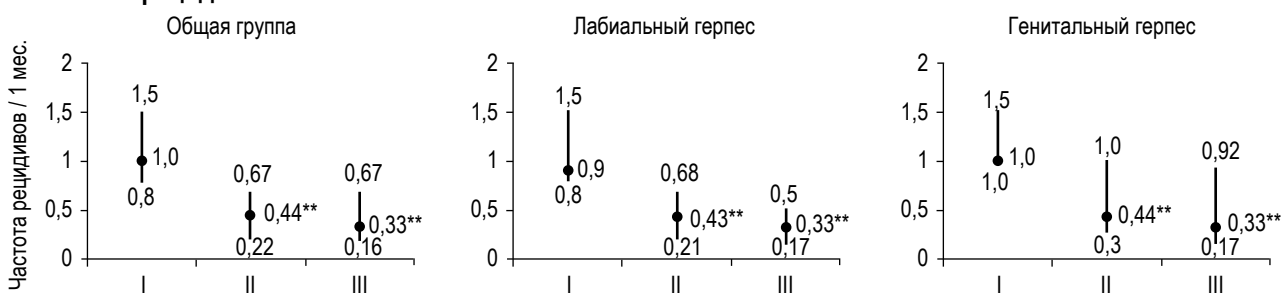
Для оценки отдаленных результатов ДК-вакцин пациентам с давностью наблюдения более 24 мес. было предложено принять участие в анкетировании. Количество пациентов, подходящих под эту категорию, составило 28 человек. С четырьмя из них контакты были утеряны. Из оставшихся 24 пациентов согласие на участие в опросе было получено от 18 (75%) участников. В эту группу вошли 8 пациентов с лабиальным и 10 с генитальным герпесом. Давность с начала иммунотерапии до момента опроса в этой группе варьировала от 36 мес. до 84 мес. с медианой 48 мес. Двенадцать пациентов дали согласие на дополнительное обследование параметров иммунитета в период анкетирования.

Как видно из данных таблицы 3, улучшение было отмечено большинством пациентов. Снижение частоты рецидивов после завершения терапии было отмечено у 77,8% пациентов, сокращение продолжительности рецидива — у 83,3% и уменьшение площади поражения у 72,2% участ-

ТАБЛИЦА 2. ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ

Тип реакции	Количество пациентов (n, %)
Локальные	
покраснение	21/29 (72,4%)
припухлость	18/29 (62%)
болезненность	24/29 (82,7%)
Системные	
слабость	6/29 (20,7%)
озноб	16/29 (55,2%)
субфебрильная лихорадка	15/29 (51,7%)
фебрильная лихорадка	0/29 (0%)
головная боль	6/29 (20,7%)
недомогание	9/29 (31%)

А. Частота рецидивов



Б. Продолжительность межрецидивного периода

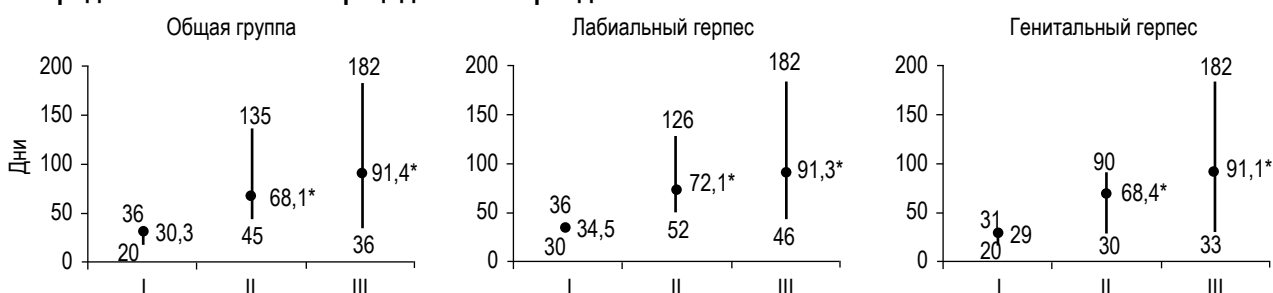


Рисунок 1. Частота рецидивов (А) и продолжительность межрецидивного периода (Б) у больных герпесом в динамике вакцинации

Примечание. Здесь и на рисунке 2 данные представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Показано количество обострений за 1 мес. (А) и длительность межрецидивного периода (дни) в общей группе больных герпесом ($n = 29$), а также в подгруппах пациентов с лабиальным ($n = 14$) и генитальным ($n = 15$) герпесом до начала лечения (I), по окончании вакцинации (II) и через 6 мес. после лечения (III). * – $p_U < 0,05$ и ** – $p_U < 0,01$ – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНКЕТИРОВАНИЯ ПАЦИЕНТОВ В ОТДАЛЕННОМ ПЕРИОДЕ

Вопросы	Число пациентов (n, %), давших позитивный ответ		
	Общая группа (n = 18)	Лабиальный герпес (n = 8)	Генитальный герпес (n = 10)
1. Отмечаете ли Вы улучшение после проведенного лечения			
– снижение частоты рецидивов	14 (77,8%)	7 (87,5%)	7 (70%)
– сокращение продолжительности рецидивов	15 (83,3%)	8 (100%)	7 (70%)
– уменьшение площади поражения	13 (72,2%)	7 (87,5%)	6 (60%)
2. Отмечаете ли Вы улучшение общего самочувствия после проведенного лечения	12 (66,7%)	6 (75%)	6 (60%)
3. Было ли ухудшение (учащение рецидивов, обострение хронических заболеваний)	1 (5,5%)	0 (0%)	1 (10%)
4. Не жалеете ли Вы, что приняли участие в клиническом исследовании	18 (100%)	8 (100%)	10 (100%)

ников анкетирования. Субъективное улучшение общего самочувствия за счет меньшей выраженности симптомов интоксикации (озноб, лихорадка, слабость, головная боль, боль в мышцах) в период обострения отметили 66,7% респондентов. Один из опрошенных (5,5%) зарегистрировал ухудшения состояния, в частности учащение рецидивов до исходного уровня в период после

завершения лечения. Ни один из респондеров не высказал сожаления в связи с участием в данном клиническом исследовании. Достоверных различий в ответах опрошенных в группах с лабиальным и генитальным герпесом не наблюдалось.

Учитывая ведущую роль реакций клеточного иммунитета в профилактике рецидива, на следующем этапе мы оценили пролифера-

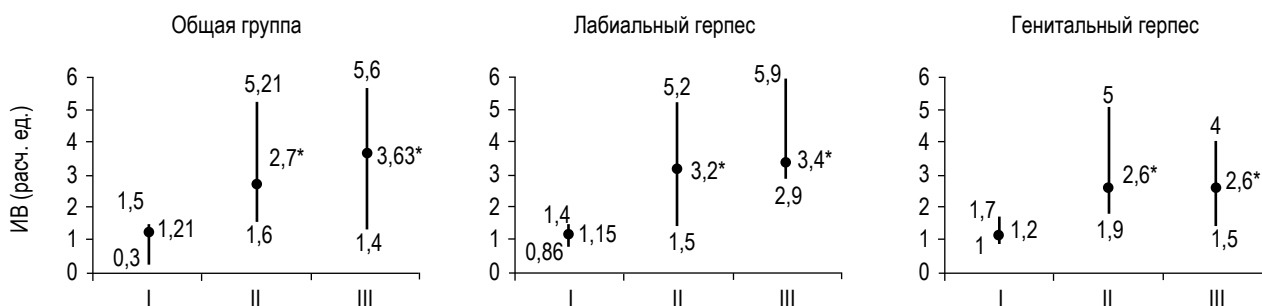
тивный ответ МНК при стимуляции вирусными антигенами (HSV1gD или HSV2gD в соответствии с типом ВПГ) и Т-клеточным митогеном КонА в динамике терапии. До начала терапии МНК пациентов с рецидивирующей ВПГ-инфекцией практически не отвечали пролиферацией на стимуляцию вирусными антигенами (рис. 2А). Медиана индексов влияния вирусных антигенов в культурах МНК (IB_{HSVgD}) составляла 1,2 расч. ед. Наличие антигенспецифического ответа ($IB_{HSVgD} > 1,5$ расч. ед.) при индивидуальном анализе выявлялось только у 6 из 29 (20%) пациентов. Вакцинация ДК сопровождалась значимым усилением антигенспецифического ответа, что проявлялось двукратным возрастанием IB_{HSVgD} после завершения лечения ($Me = 2,7$ расч. ед.) в целом по группе и регистрацией антигенспецифического ответа у 24/29 (82,7%) пациентов. В ближайшем периоде наблюдения (через 6 мес. после завершения вакцинотерапии) IB_{HSVgD} продолжал умеренно возрастать до 3,63 расч. ед. Индуцированный антигенспецифический ответ в эти сроки выявлялся у 25/29 (86%) пациентов. При сравнении пациентов с лабиальной и генитальной формой инфекции значимых различий на уровне медианных значений пролиферативного ответа на вирусные антигены не выявлялось. Тем не менее все 4 пациента, у которых антигенспецифический

ответ через 6 мес. наблюдения отсутствовал, имели генитальную форму герпеса.

Ранее было отмечено, что снижение частоты рецидивов на фоне лечения регистрировалось у 25 из 29 человек, при этом IB_{HSVgD} в данной подгруппе больных был достоверно выше, чем у 4 пациентов, не ответивших на вакцинотерапию ($MeIB_{HSVgD} = 3,2 [Q_{0,25}-Q_{0,75} 1,7-5,4]$ против 1,68 расч. ед. [$Q_{0,25}-Q_{0,75} 0,98-2,1$]; $p_U = 0,03$). Таким образом, снижение частоты рецидивов ассоциировалось с индукцией антигенспецифического ответа, тогда как низкая реактивность на стимуляцию вирусными антигенами была сопряжена с отсутствием значимого клинического эффекта.

Анализ митогенной реактивности МНК больных с рецидивирующей герпес-вирусной инфекцией показал, что исходно ответ на КонА у пациентов был достоверно снижен (17150 ± 1470 имп/мин у здоровых доноров; $p_U < 0,05$). К моменту завершения терапии отмечалось возрастание КонА-индуцированной пролиферации (в среднем до 22620 имп/мин, $p_U < 0,05$), которое сохранялось на уровне 24800 имп/мин ($p_U < 0,05$) через 6 мес. наблюдения после завершения терапии. В эти сроки значения $IB_{КонА}$ достоверно превышали соответствующие показатели до лечения (рис. 2Б). Умеренное возрастание митогенной реактивности на фоне

А. Индексы влияния вирусных антигенов (HSVgD)



Б. Индексы влияния митогена конканавалина А (КонА)

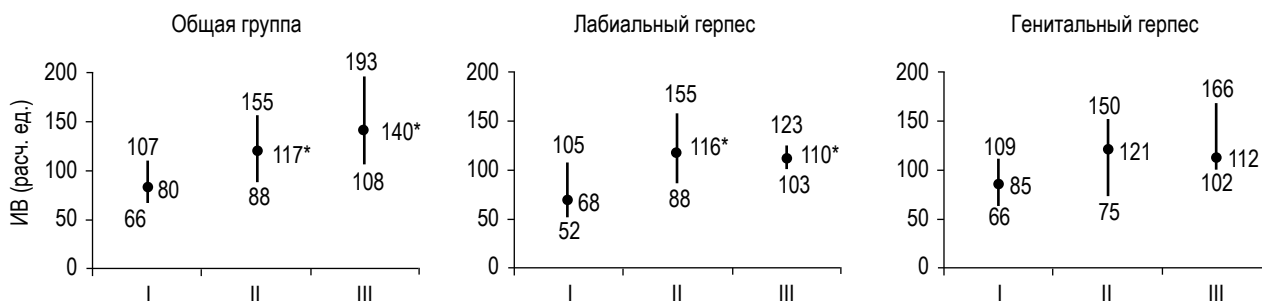


Рисунок 2. Антигенспецифическая и митогенная реактивность МНК больных герпесом в динамике вакцинотерапии

Примечание. Представлены ($Me; Q_{0,25}-Q_{0,75}$) индексы влияния (IB , расч. ед.) вирусных антигенов (А) и митогена КонА (Б) на интенсивность пролиферации МНК больных герпесом: в целом по группе ($n = 29$), а также в подгруппах пациентов с лабиальным ($n = 14$) и генитальным ($n = 15$) герпесом до начала лечения (I), по окончании вакцинотерапии (II) и через 6 мес. после лечения (III). * – $p_U < 0,05$ – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (U – непараметрический критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

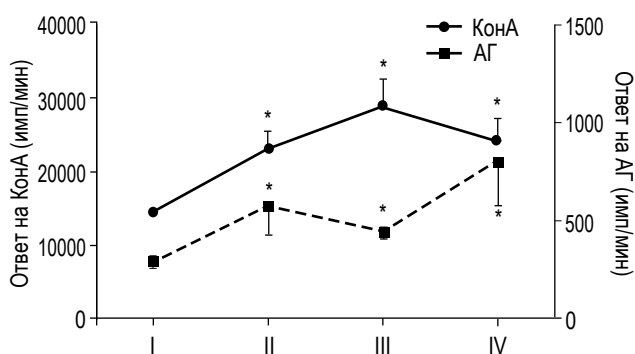


Рисунок 3. Проллиферативный ответ МНК больных герпесом в динамике вакцинотерапии и в отдаленный период наблюдения

Примечание. Данные в виде $M \pm SE$ (имп/мин) представлены в связанных выборках больных герпесом ($n = 12$), включая 7 пациентов с лабиальным и 5 с генитальным герпесом. По левой оси ординат – ответ на митоген (КонА), по правой – ответ на вирусный антиген (HSV-gD). По оси абсцисс: I – до начала лечения; II – по окончании вакцинотерапии; III – через 6 мес. после лечения; IV – через 48 мес. после лечения. * – $p_w < 0,05$ – достоверность различия показателей по сравнению с исходными значениями (W – непараметрический критерий Вилкоксона для связанных выборок).

9-месячного периода терапии и 6-месячного периода последующего наблюдения отмечалось как у больных с лабиальным, так и генитальным герпесом, однако были достоверными только у пациентов с лабиальной формой инфекции, отличающихся исходно более низким ответом МНК на КонА. Характерно, что между интенсивностью антигенспецифического ответа и митогенной реактивностью на момент завершения терапии корреляционной зависимости не наблюдалось ($R_s = -0,2$; $p = 0,31$).

Оценка антигенспецифического и КонА-индуцированного пролиферативного ответа в отдаленном периоде (Ме 48 мес.) была проведена в группе 12 пациентов (рис. 3). Видно, что по окончании вакцинотерапии уровень пролиферации МНК на вирусный антиген в этой группе значимо возрос. Причем усиление антигенспецифического ответа сохранялось не только через 6 мес. после лечения, но и в отдаленном периоде. В эти сроки наличие антигенспецифического ответа ($ИВ_{HSVgD} > 1,5$ расч. ед.) отмечалось у 8 из 12 пациентов (66,7%) пациентов, при этом в среднем значения $ИВ_{HSVgD}$ составляли 2,6 расч. ед. Аналогичным образом возрастание КонА-индуцированной пролиферации после курса вакцинаций и 6-месячного периода наблюдения сохранялось в отдаленном периоде, когда уровень ответа значимо превышал исходный уровень пролиферативного ответа.

Обсуждение

Интерес к иммунотерапевтическим подходам в лечении рецидивирующих форм герпес-вирусной инфекции обусловлен двумя причинами – важной ролью иммунной системы в защите от вируса и недостаточной эффективностью противовирусных препаратов. Современная противовирусная терапия ациклическими нуклеотидами не способна обеспечить полную элиминацию вируса, предотвращения рецидива заболевания и нормализации иммунологических показателей. В связи с этим разработка новых методов активации иммунного ответа является важным компонентом комплексного лечения герпесвирусной инфекции. Среди различных методов иммунотерапии ДК-вакцины представляют особый интерес, поскольку способны индуцировать иммунный ответ к строго-специфическим вирусным антигенам. Безопасность ДК-вакцин, генерируемых в присутствии GM-CSF и IL-4, была продемонстрирована на здоровых волонтерах, пациентах с хроническим вирусным гепатитом В и С, а также ВИЧ-инфекцией [18, 26, 42].

В настоящем исследовании впервые проведена оценка безопасности и эффективности ДК-вакцин у пациентов с рецидивирующими формами лабиального и генитального герпеса. Полученные результаты показали, что вакцинация пациентов с рецидивирующей герпес-вирусной инфекцией ДК, нагруженными рекомбинантным вирусным гликопротеином D (HSVgD), не вызывает серьезных нежелательных эффектов, что свидетельствует о хорошей переносимости ДК-вакцин в клинической практике.

Важно отметить, что на фоне лечения, т.е. за период 9 мес., на протяжении которых проводился иницирующий и поддерживающий курс вакцинаций, количество рецидивов сократилось в 2,3 раза, а длительность ремиссии возросла с 30 до 68 дней. Схожие результаты, т.е. двукратное сокращение частоты рецидива, выявлялись в процессе проведения 4 мес. курсов ацикловира [24, 31], а также в период 6 мес. наблюдения после комбинации противовирусной терапии с иммунокорректирующей терапией полиоксидонием [5]. Однако в нашем исследовании сокращение частоты рецидивов наблюдалось у пациентов, не получавших ациклических нуклеозидов, и срок наблюдения составлял 9 мес.

В ближайшем периоде (в течение 6 мес.) после прекращения лечения эффект терапии сохранялся и даже несколько усиливался, о чем свидетельствовали 3-кратное снижение частоты рецидивов и возрастание средней продолжительности ремиссии до 91 сут. При индивидуальном анализе снижение частоты регистрировалось

у 76% пациентов, у оставшихся 24% пациентов рецидивы возобновились до исходного уровня. Эффективность ДК-вакцин в группах с лабиальным и генитальным герпесом на уровне медианных значений была схожей, тем не менее полное прекращение рецидивов на фоне лечения и последующего 6-месячного наблюдения выявлялось только в группе с лабиальным герпесом у ограниченного числа пациентов (21%).

В отдаленном периоде (в среднем через 48 мес. после начала терапии) улучшение в виде сокращения частоты рецидивов, длительности обострения или площади поражения отмечалось у 72-83% опрошенных.

Важно отметить, что клинический ответ ассоциировался с индукцией антигенспецифического ответа на гликопротеин D, который использовался как для нагрузки ДК, так и последующего выявления у пациентов реактивности к данному антигену. Гликопротеины D ВПГ1 и ВПГ2 (HCV1gD или HCV2gD), будучи локализованными в оболочке вирионов, являются иммунодоминантными вирусными антигенами, распознаются Т-клетками и индуцируют клеточный и гуморальный противовирусный иммунный ответ [9, 39]. Оценка пролиферативного ответа МНК к HCV1gD или HCV2gD показала практически полное отсутствие исходной реактивности МНК к указанным антигенам (пролиферативный ответ выявлялся только у 20% пациентов, а медианный индекс стимуляции вирусных антигенов составлял 1,2 расч. ед.). Проведение вакцинотерапии сопровождалось развитием антигенспецифического ответа, который проявлялся возрастанием ИВ_{HSVgD} до 2,7 расч. ед. по завершении терапии и до 3,6 расч. ед. после 6-месячного наблюдения. Наличие реактивности к вирусным антигенам в эти сроки выявлялось, соответственно, у 82,7 и 86,2 % пациентов. При этом подгруппа пациентов, не ответивших на терапию снижением частоты рецидивов, отличалась достоверно более низким уровнем антигенспецифического ответа.

Наряду с антигенспецифическим ответом, мы также проанализировали пролифератив-

ную активность МНК на Т-клеточный митоген КонА. Согласно полученным нами ранее данным и данным литературы, снижение пролиферативной активности МНК на КонА является одним из интегральных проявлений иммунных нарушений Т-клеток и может быть обусловлено Т-клеточной анергией или Th1-Th2 переключением [4, 11]. Вакцинация ДК сопровождалась умеренным возрастанием исходно сниженной КонА-индуцированной пролиферации МНК до нормативного уровня, который сохранялся в ближайшем и отдаленном периодах. Поскольку корреляционной зависимости между антигенспецифическим ответом и митогенной реактивностью не наблюдалось к моменту завершения терапии, возрастание ответа на КонА было расценено нами как результат снижения иммуносупрессивного эффекта вирусной инфекции на фоне уменьшения частоты рецидивов. Ингибирующий эффект ВПГ-1 и ВПГ-2 у пациентов с рецидивирующим течением инфекции является хорошо известным феноменом и обусловлен различными механизмами, включая переключение Th1-/Th2-баланса и экспансию регуляторных Т-клеток [2, 27, 28, 36]. С этой точки зрения сопряженность между снижением частоты инфекции и восстановлением митогенной реактивности является очередным подтверждением важной роли Т-клеточного иммунитета в предотвращении рецидивов герпетической инфекции.

Полученные в целом результаты свидетельствуют, что иммунотерапия на основе ДК позволяет уменьшить число рецидивов и, соответственно, увеличить продолжительность безрецидивного периода, что сопряжено с активацией специфического и неспецифического иммунного ответа. Это позволяет рассматривать интерферон- α -индуцированные ДК, нагруженные HSVgD антигеном, в качестве перспективных кандидатов в лечении рецидивирующих форм герпетической инфекции.

Список литературы / References

1. Веретенникова М. Современная фармакотерапия герпеса с использованием различных лекарственных форм // Фундаментальные исследования, 2014. № 8. С. 1630-1634. [Veretennikova M.A. Current treatment of herpes with using different pharmaceutical forms. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2014, no. 8, pp. 1630-1634. (In Russ.)]
2. Желтова О.И., Старостина Н.М., Тихонова М.А., Леплина О.Ю., Черных Е.Р., Останин А.А. Особенности иммунитета больных с хроническими рецидивирующими инфекциями // Иммунология, 2011. № 4. С. 205-209. [Zheltova O.I., Starostina N.M., Tikhonova M.A., Leplina O.Yu., Chernykh E.R., Ostanin A.A. Immunity features of patients with chronic recurrent infections. *Immunologiya = Immunology*, 2011, no. 4, pp. 205-209. (In Russ.)]
3. Леплина О.Ю., Желтова О.И., Борисова А.Е., Старостина Н.М., Останин А.А., Черных Е.Р. Вакцины на основе дендритных клеток в лечении герпетической инфекции // Вестник Уральской медицинской академической науки, 2011. №2/2 (35). С. 38-39. [Leplina O.Yu., Zheltova O.I., Borisova A.E., Starostina N.M., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Dendritic cells vaccines in the treatment of herpetic infection. *Vestnik Ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki = Bulletin of the Ural Medical Academic Science*, 2011, no. 2/2 (35), pp. 38-39. (In Russ.)]

4. Черных Е.Р., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Курганова Е.В., Стрельцова Е.И., Останин А.А., Козлов В.А. Феномен Т-клеточной анергии при хирургическом сепсисе // Медицинская иммунология, 2003. Т. 5, № 5/6. С. 529-538. [Chernykh E.R., Lepkina O.Yu., Tikhonova M.A., Kurganova E.V., Streltsova E.I., Ostanin A.A., Kozlov V.A. T cell anergy in surgical sepsis. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2003, Vol. 5, no. 5-6, pp. 529-538. (In Russ.)]
5. Шульженко А.Е., Зуйкова И.Н. Подходы к иммунотерапии рецидивирующего простого герпеса // Эффективная фармакотерапия в акушерстве и гинекологии, 2010. №3. С. 44-49. [Shulzhenko A.E., Zuikova I.N. Approaches to the immunotherapy of recurrent herpes simplex. *Effektivnaya farmakoterapiya v akusherstve i ginekologii = Effective Pharmacotherapy*, 2010, no. 3, pp. 44-49. (In Russ.)]
6. Aurelian L. Herpes simplex virus type 2 vaccines: new ground for optimism? *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, Vol. 11, no. 3, pp. 437-445.
7. Bedoui S., Gebhardt T. Interaction between dendritic cells and T cells during peripheral virus infections: a role for antigen presentation beyond lymphoid organs. *Curr. Opin. Immunol.*, 2011, Vol. 23, no. 1, pp. 124-130.
8. Bedoui S., Greyer M. The role of dendritic cells in immunity against primary herpes simplex virus infections. *Front Microbiol.*, 2014, no. 5, p. 533.
9. BenMohamed L., Bertrand G., McNamara C.D., Gras-Masse H., Hammer J., Wechsler S.L., Nesburn A.B. Identification of novel immunodominant CD4⁺ Th1-type T-cell peptide epitopes from herpes simplex virus glycoprotein D that confer protective immunity. *J. Virol.*, 2003, Vol. 77, no. 17, pp. 9463-9473.
10. Bettahi I., Zhang X., Afifi R.E., BenMohamed L. Protective immunity to genital herpes simplex virus type 1 and type 2 provided by self-adjuncting lipopeptides that drive dendritic cell maturation and elicit a polarized Th1 immune response. *Viral Immunol.*, 2006, Vol. 19, no. 2, pp. 220-236.
11. Bitan M., Weiss L., Reibstein I., Zeira M., Fellig Y., Slavin S., Zcharia E., Nagler A., Vlodavsky I. Heparanase upregulates Th2 cytokines, ameliorating experimental autoimmune encephalitis. *Mol. Immunol.*, 2010, Vol. 47, no. 10, pp. 1890-1898.
12. Bourne N., Bravo F.J., Francotte M., Bernstein D.I., Myers M.G., Slaoui M., Stanberry L.R. Herpes simplex virus (HSV) type 2 glycoprotein D subunit vaccines and protection against genital HSV-1 or HSV-2 disease in guinea pigs. *J Infect Dis.*, 2003, Vol. 187, no. 4, pp. 542-549.
13. Chi C.C., Wang S.H., Delamere F.M., Wojnarowska F., Peters M.C., Kanjirath P.P. Interventions for prevention of herpes simplex labialis (cold sores on the lips). *Cochrane Database Syst Rev.*, 2015, no. 8, CD010095.
14. Cunningham A., Griffiths P., Leonc P., Mindeld A., Patele R., Stanberry L., Whitley R. Current management and recommendations for access to antiviral therapy of herpes labialis. *J. Clin. Virol.*, 2012, Vol. 53, no. 1, pp. 6-11.
15. 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.
16. Dhodapkar M.V., Steinman R.M., Sapp M., Desai H., Fossella C., Krasovsky J., Donahoe S.M., Dunbar P.R., Cerundolo V., Nixon D.F., Bhardwaj N. Rapid generation of broad T-cell immunity in humans after a single injection of mature dendritic cells. *J. Clin. Invest.*, 1999, Vol. 104, no. 2, pp. 173-180.
17. Dyakonova V.A., Dambaeva S.V., Pinegin B.V., Khaitov R.M. Study of interaction between the polyoxonium immunomodulator and the human immune system cells. *Int. Immunopharmacol.*, 2004, Vol. 4, no. 13, pp. 1615-1623.
18. Garcia F., Plana M., Climent N., Leon A., Gatell J.M., Gallart T. Dendritic cell based vaccines for HIV infection: the way ahead. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013, Vol. 9, no. 11, pp. 2445-2452.
19. Ghasemi M., Erturk M., Buruk K., Sonmez M. Induction of potent protection against acute and latent herpes simplex virus infection in mice vaccinated with dendritic cells. *Cytotherapy*, 2013, Vol. 15, no. 3, pp. 352-361.
20. Kabanov V.A. From synthetic polyelectrolytes to polymer-subunit vaccines. *Pure Appl. Chem.*, 2004, Vol. 76, no. 9, pp. 1659-1677.
21. Kobelt D., Lechmann M., Steinkasserer A. The interaction between dendritic cells and herpes simplex virus-1. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2003, Vol. 276, pp. 145-161.
22. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihofer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J. Transl. Med.*, 2007, Vol. 5, pp. 46-57.
23. Le Cleach L., Trinquart L., Do G., Maruani A., Lebrun-Vignes B., Ravaut P., Chosidow O. Oral antiviral therapy for prevention of genital herpes outbreaks in immunocompetent and nonpregnant patients. *Cochrane Database Syst Rev.*, 2014, no. 8, CD009036.
24. Lebrun-Vignes B., Bouzamondo A., Dupuy A., Guillaume J.C., Lechat P., Chosidow O. A meta-analysis to assess the efficacy of oral antiviral treatment to prevent genital herpes outbreaks. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2007, Vol. 57, no. 2, pp. 238-246.
25. Lee H.K., Zamora M., Linehan M.M., Iijima N., Gonzalez D., Haberman A., Iwasaki A. Differential roles of migratory and resident DCs in T cell priming after mucosal or skin HSV-1 infection. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 2, pp. 359-370.
26. Luo J., Li J., Chen R.L., Nie L., Huang J., Liu Z.W., Luo L., Yan X.J. Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: A pilot, open label, clinical trial in human volunteers. *Vaccine*, 2010, Vol. 28, no. 13, pp. 2497-2504.
27. McKenna D.B., Neill W.A., Norval M. Herpes simplex virus specific immune responses in subjects with frequent and infrequent orofacial recurrences. *Br. J. Dermatol.*, 2001, Vol. 144, no. 3, pp. 459-464.
28. Mysliwska J., Trzonkowski P., Bryl E., Lukaszuk K., Mysliwski A. Lower interleukin-2 and higher serum tumor necrosis factor levels are associated with perimenstrual, recurrent, facial herpes simplex infection in young women. *Eur. Cytokine Netw.*, 2000, Vol. 11, no. 3, pp. 397-406.
29. Pollara G., Speidel K., Samady L., Rajpopat M., McGrath Y., Ledermann J., Coffin R.S., Katz D.R., Chain B. Herpes simplex virus infection of dendritic cells: balance among activation, inhibition, and immunity. *J. Infect. Dis.*, 2003, Vol. 187, no. 2, pp. 165-178.
30. Powell B.S., Andrianov A.K., Fusco P.C. Polyionic vaccine adjuvants: another look at aluminum salts and polyelectrolytes. *Clin. Exp. Vaccine Res.*, 2015, Vol. 4, no. 1, pp. 23-45.
31. Rooney J.F., Straus S.E., Mannix M.L., Wohlenberg C.R., Alling D.W., Dumois J.A., Notkins A.L. Oral acyclovir to suppress frequently recurring herpes labialis. A double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.*, 1993, Vol. 118, no. 4, pp. 268-272.
32. Sancho-Shimizu V., Perez De Diego R., Jouanguy E., Zhang S.Y., and Casanova, J. L. Inborn errors of anti-viral interferon immunity in humans. *Curr. Opin. Virol.*, 2011, Vol. 1, no. 6, pp. 487-496.
33. Santini S., Pucchini T., Lapenta C., Parlato S., Logozzi M., Belardelli F. A new type 1 IFN-mediated pathway for the rapid differentiation of monocytes into highly active dendritic cells. *Stem. Cells*, 2003, Vol. 21, no. 3, pp. 357-362.

34. Schon E., Harandi A.M., Nordstrom I., Holmgren J., Eriksson K. Dendritic cell vaccination protects mice against lethality caused by genital herpes simplex virus type-2 infection. *J. Reprod. Immunol.*, 2001, Vol. 50, no. 2, pp. 87-104.
35. Shin H., Iwasaki A. Generating protective immunity against genital herpes. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 10, pp. 487-494.
36. Singh R., Kumar A., Creery W.D., Ruben M., Giulivi A., Diaz-Mitoma F. Dysregulated expression of IFN-gamma and IL-10 and impaired IFN-gamma-mediated responses at different disease stages in patients with genital herpes simplex virus-2 infection. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 133, no. 1, pp. 97-107.
37. Stanberry L.R., Cunningham A.L., Mindel A., Scott L.L., Spruance S.L., Aoki F.Y., Lacey C.J. Prospects for control of herpes simplex virus disease through immunization. *Clin. Infect. Dis.*, 2000, Vol. 30, no. 3, pp. 549-566.
38. Stanberry L.R., Spruance S.L., Cunningham A.L., Bernstein D.I., Mindel A., Sacks S., Tyring S., Aoki F.Y., Slaoui M., Denis M., Vandepapeliere P., Dubin G. GlaxoSmithKline Herpes Vaccine Efficacy Study Group. Glycoprotein-D-adjuvant vaccine to prevent genital herpes. *N. Engl. J. Med.*, 2002, Vol. 347, no. 21, pp. 1652-1661.
39. Straus S.E., Takiff H.E., Seidlin M., Bachrach S., Lininger L., Di Giovanna J.J., Western K.A., Smith H.A., Lehrman S.N., Creagh-Kirk T. Suppression of frequently recurring genital herpes. A placebo-controlled double-blind trial of oral acyclovir. *N. Engl. J. Med.*, 1984, Vol. 310, no. 24, pp. 1545-1550.
40. Thurner B., Roder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kampgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications. *J. Immunol. Meth.*, 1999, Vol. 223, no. 1, pp. 1-15.
41. Van Lint A., Ayers M., Brooks A.G., Coles R.M., Heath W.R., Carbone F.R. Herpes simplex virus-specific CD8⁺ T cells can clear established lytic infections from skin and nerves and can partially limit the early spread of virus after cutaneous inoculation. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 172, no. 1, pp. 392-397.
42. Zabaleta A., D'Avola D., Echeverria I., Llopiz D., Silva L., Villanueva L., Riezu-Boj J., Larrea E., Pereboev A., Lasarte J., Rodriguez-Lago I., Inarrairaegui M., Sangro B., Prieto J., Sarobe P. Clinical testing of a dendritic cell targeted therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2015, Vol. 2, p. 15006.
43. Zhu J., Peng T., Johnston C., Phasouk K., Kask A.S., Klock A. Immune surveillance by CD8- α + skin-resident T cells in human herpes virus infection. *Nature*, 2013, Vol. 497, pp. 494-497.

Авторы:

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

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

Блинова Д.Д. — врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Желтова О.И. — к.м.н., врач-иммунолог отделения иммунологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Олейник Е.А. — аспирант, лаборатория 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

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:

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

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

Blinova D.D., Doctor (Immunology), Department of Immunology, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Zheltova O.I., PhD (Medicine), Doctor (Immunology), Department of Immunology, Clinics of Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Oleinik E.A., Postdoc Fellow, 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

Ostanin 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 02.10.2015

Принята к печати 04.12.2015

Received 02.10.2015

Accepted 04.12.2015

ОСОБЕННОСТИ СЕКРЕЦИИ ХЕМОКИНОВ МОНОНУКЛЕАРНЫМИ И ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ: РОЛЬ ГИСТАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ H₃/H₄-ТИПА

Евстратова В.С., Ригер Н.А., Никитюк Д.Б., Ханферьян Р.А.

ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

Резюме. В работе представлены результаты исследования влияния антагониста H₃/H₄ гистаминовых рецепторов (Ципроксифан) на секреторную активность дендритных клеток (ДК) и мононуклеарных клеток периферической крови (МПК). Установлено, что блокада гистаминовых рецепторов H₃/H₄-типа *in vitro* различно влияет на синтез основных хемокинов (Eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, GRO-α, IL-8) МПК и ДК, выращенными из них. Так, в культуре ДК секреция RANTES, GRO-α снижалась на 20 и 40% соответственно, в то время как секреция MIP-1β практически не изменялась, а секреция MCP-1 в 4 раза увеличивалась. В культурах МПК же достоверно усиливалась секреция Eotaxin, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, GRO-α, IL-8 (p < 0,05).

Ключевые слова: хемокины, цитокины, гистаминовые рецепторы, иммунитет, дендритные клетки, мононуклеарные клетки периферической крови

CHEMOKINE SECRETION PATTERNS IN MONONUCLEAR AND DENDRITIC CELLS: ROLE OF HISTAMINE TYPE H₃/H₄ RECEPTORS

Evstratova V.S., Riger N.A., Nikityuk D.B., Khanferyan R.A.

Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The study presents results concerning effects of H₃/H₄ histamine receptors antagonist (Ciproxifan) upon *in vitro* chemokine secretion by dendritic cells (DC) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC). We have been shown that *in vitro* inhibition of type H₃/H₄ histamine receptor affects in different ways production of major chemokines by PBMC and DC, including eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, GRO-α, and IL-8. E.g., RANTES and GRO-α secretion in DC cultures was reduced, respectively, by 20% and 40%. Meanwhile, MIP-1β secretion was virtually unchanged, whereas MCP-1 secretion exhibited a four-fold increase. In PBMC cultures, the H₃/H₄ receptor antagonist induced a significant increase in eotaxin, RANTES, MIP-1α, MIP-1β, GRO-α, and IL-8 secretion (p < 0.05).

Keywords: chemokines, cytokines, histamine receptors, immunity, dendritic cells, peripheral blood mononuclear cells

Адрес для переписки:

Ханферьян Роман Авакович
ФГБУН «Федеральный исследовательский центр
питания, биотехнологии и безопасности пищи»
109240, Россия, Москва, Устьинский проезд, 2/14.
Тел.: 8 (495) 698-53-45.
E-mail: khanferyan@ion.ru

Address for correspondence:

Khanferyan Roman A.
Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology
109240, Russian Federation, Moscow, Ustyinsky pas., 2/14.
Phone: 7 (495) 698-53-45.
E-mail: khanferyan@ion.ru

Образец цитирования:

В.С. Евстратова, Н.А. Ригер, Д.Б. Никитюк,
Р.А. Ханферьян «Особенности секреции хемокинов
мононуклеарными и дендритными клетками: роль
гистаминовых рецепторов H₃/H₄-типа» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 437-442.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-437-442

© Евстратова В.С. и соавт., 2016

For citation:

V.S. Evstratova, N.A. Riger, D.B. Nikityuk, R.A. Khanferyan
“Chemokine secretion patterns in mononuclear and dendritic cells:
role of histamine type H₃/H₄ receptors”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 5,
pp. 437-442. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-437-442

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-437-442>

Введение

Формирование клеточного звена иммунного ответа включает в себя дифференцировку гемопоэтических предшественников, их миграцию в лимфоидные и нелимфоидные органы и терминальное созревание клеток для участия в иммунном ответе. На эти процессы оказывают влияние многочисленные растворимые факторы и их рецепторы, секретируемые на каждом этапе функционирования иммунной системы [14, 15]. Одним из них является гистамин — медиатор широкого спектра физиологических и патофизиологических реакций в живых организмах, один из важнейших биогенных аминов, часто модулирующий антагонистические механизмы иммунорегуляции [1, 6, 9, 11, 13, 19]. Биологические эффекты гистамина реализуются через специфические сигнальные пути, представленные четырьмя известными типами G-мембранных рецепторов-лигандов (H_1R , H_2R , H_3R и H_4R), внутриклеточной гистамин-связывающей системой, принадлежащей к семейству цитохрома P450, механизмами трансмембранного переноса ОСТ (Organic Cation Transporter; OCT3), которые реализуют связь при межклеточных взаимодействиях. Различная экспрессия и эффекторная функция участков и структур этого сигнального пути зависит от стадии созревания/дифференцировки, тканевой принадлежности и активности клеток-мишеней, на основании чего развиваются многообразные реакции в биологических системах [2, 4, 12, 18, 21, 23]. В настоящее время накоплено значительное количество данных, свидетельствующих об экспрессии на поверхности мононуклеаров периферической крови (МПК) и дендритных клеток (ДК) всех 4-х известных типов H-рецепторов [3, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 22, 23].

Однако влияние гистамина и гистаминовых рецепторов на регуляцию секреторной активности МПК и ДК остается невыясненным. В последние годы пристальное внимание уделяется новым типам гистаминовых рецепторов H_3/H_4 -типа. Показано, что гомология этих рецепторов составляет до 58% [1], и они обладают большим сродством к гистамину по сравнению с рецепторами H_1 -типа, преимущественно экспрессируются на гемопоэтических предшественниках и клетках различных тканей [10, 23]. Для более глубокого понимания гистаминовой регуляции этих процессов нами было выполнено исследование, целью которого был сравнительный анализ синтеза хемокинов МПК и ДК, а также исследо-

вание роли новых типов гистаминовых рецепторов в этом процессе.

Материалы и методы

Цельную кровь 10 практически здоровых доноров забирали в пробирки с ЭДТА (1,6 мг K_3EDTA на 1 см³ крови) с последующим разведением в два раза фосфатно-солевым буфером без Ca^{2+} и Mg^{2+} (ПанЭко, Россия). МПК выделяли из периферической крови в градиенте плотности фиколл-урографина 1,077 (ПанЭко, Россия) по общепринятой методике. ДК культивировали из МПК в среде RPMI-1640 с L-глутамином (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Biological Industries, Израиль) в культуральных планшетах из расчета 1×10^6 клеток в 1 мл, содержащей 10 нг/мл IL-4 (PAN-Biotech, Germany) и 1000 ЕД/мл гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) (PAN-Biotech, Germany). На 2-е, 4-е и 6-е сутки производили замену культуральной среды. На 8-е сутки обновляли среду, добавляли к культуре клеток обратный агонист H_3/H_4 -рецепторов Ципроксифан (Ciproxifan) (Sigma Chemical Co.) в конечной концентрации $10^{-5}M$ и инкубировали в течение 30 минут. Клетки отмывали и культивировали в полной среде RPMI-1640 с L-глутамином (ПанЭко, Россия) 48 часов при 37 °C, относительной влажности 96% и 5% CO_2 . В качестве контроля использовались супернатанты спонтанных культур ДК. Отдельно МПК тех же доноров обрабатывали в течение 30 минут Ципроксифаном, клетки отмывали и культивировали 48 часов в 96-луночных планшетах 1×10^6 клеток в 1 мл среды в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , при 37 °C и 96% влажности. Контролем служили спонтанные культуры МПК. Супернатанты собирали в стерильные пластиковые пробирки и хранили при -20 °C.

Концентрацию (pg/ml) хемокинов (Eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1 α и β , GRO- α , IL-8) в супернатантах измеряли иммунофлюоресцентным методом с использованием коммерческого набора для мультиплексного анализа «ProcartaPlex™ H.Cyto-/Chemokine/Growth Factor Panel 1» (eBioscience, Австрия) на анализаторе Luminex 200 (Luminex Corporation, USA) с программным обеспечением ProcartaPlex™ Analyst 1.0. Из-за значительного разброса данных влияние блокады H_3/H_4 -рецепторов на секрецию Eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1 α и β , GRO- α и IL-8 оценивали по соотношению уровней хемокинов в супернатантах культур с блокирован-

ными H_3/H_4 -рецепторами и спонтанных культур МПК и ДК (И/С). Полученные данные обрабатывали с использованием пакета статистических формул Microsoft Office Excel 2011.

Результаты

Исследованиями установлено, что оба типа клеток — МПК и ДК — обладали выраженной способностью к спонтанной секреции ряда хемокинов (Eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , GRO- α , IL-8), участвующих в регуляции клеточной миграции (табл. 1.). Однако имеются определенные отличия в степени секреции различных хемокинов. Так, МПК обладают достоверно большей способностью к секреции MIP-1 α и MIP-1 β ($p < 0,05$) по сравнению с ДК. В то же время ДК в большей степени, чем МПК, секретируют Eotaxin, MCP-1, GRO- α и IL-8 ($p < 0,05$) (табл. 1). Спонтанная секреция RANTES в культурах МПК и ДК достоверно не различалась. Однако ДК отдельных доноров могут обладать способностью секретировать более высокие количества этого хемокина по сравнению с МПК (188,8 $\pm$ 163,44 (мин. 39,58 — макс. 419,26) и 140,8 $\pm$ 45,59 pg/ml (мин. 104,48 — макс. 257,32) соответственно).

Блокада H_3/H_4 -рецепторов МПК вызывает достоверный рост секреции Eotaxin, RANTES,

MIP-1 α , MIP-1 β , GRO- α и IL-8 ($p < 0,05$, рис. 1, табл. 1). Под влиянием рецепторного антагониста наблюдался некоторый, однако статистически недостоверный рост продукции MCP-1 ($p > 0,05$). В культурах ДК ципроксифан более чем в 4 раза стимулирует секрецию MCP-1 ($p < 0,05$) и усиливает продукцию ряда других хемокинов, в частности Eotaxin ($p < 0,05$), IL-8 ($p < 0,05$) и MIP-1 α . Синтез RANTES и GRO- α под влиянием H_3/H_4 -блокады рецепторов ДК снижается соответственно на 20 и 40% ($p < 0,05$). При этом антагонист гистаминовых рецепторов не влияет на продукцию MIP-1 β .

Обсуждение

В последние годы установлено, что уже на стадии плюрипотентных гемопоэтических предшественников гистамин и гистаминовые рецепторы вовлечены в механизмы регуляции секреторной активности клеток [5]. Наряду с другими типами гистаминовых рецепторов (H_1 -, H_2 - и, по-видимому, H_3 -типа) наиболее важная роль в регуляции секреторной активности иммунных клеток отводится H_4 гистаминовым рецепторам, обнаруженным в 2000 году и экспрессирующимся практически на всех клетках иммунной системы. Активация H_4 -рецепторов селективными агонистами вызывает угнетающее влияние

ТАБЛИЦА 1. ВЛИЯНИЕ АНТАГОНИСТА H_3/H_4 ГИСТАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ (ЦИПРОКСИФАН) НА СЕКРЕЦИЮ ХЕМОКИНОВ МПК И ДК

Наименование хемокина	МПК (M $\pm$ S): pg/ml		ДК (M $\pm$ S): pg/ml	
	Контроль (спонтанный синтез)	Ципроксифан	Контроль	Ципроксифан
Eotaxin*	6,8 $\pm$ 0,73	13,2 $\pm$ 1,95**	23,9 $\pm$ 2,02	29,3 $\pm$ 6,08**
RANTES	140,8 $\pm$ 45,59	710,3 $\pm$ 426,51**	188,8 $\pm$ 163,44	161,2 $\pm$ 145,48**
MCP-1*	4663,4 $\pm$ 1020,96	5283,5 $\pm$ 1512,27	11520,7 $\pm$ 2209,35	52128,4 $\pm$ 13063,31**
MIP-1 α *	994, 8 $\pm$ 287,06	2293,4 $\pm$ 1211,31**	305,8 $\pm$ 174,22	405,8 $\pm$ 225,89
MIP-1 β *	4812,2 $\pm$ 2224,18	10451,7 $\pm$ 7869,14**	3682,3 $\pm$ 1068,15	5467,7 $\pm$ 4285,81
GRO- α *	533,4 $\pm$ 135,48	2062,2 $\pm$ 1087,94**	2218,6 $\pm$ 905,51	1410,3 $\pm$ 596,23**
IL-8*	4430,9 $\pm$ 1555,41	19994,8 $\pm$ 1702,38**	6678,6 $\pm$ 1079,68	7498,6 $\pm$ 232,59**

Примечание. * — $p < 0,05$ — различия в концентрации хемокинов в спонтанной (контроль) секреции между культурами МПК и ДК;

** — $p < 0,05$ — различия в концентрации хемокинов в спонтанной (контроль) секреции и обусловленной антагонистом гистаминовых рецепторов.

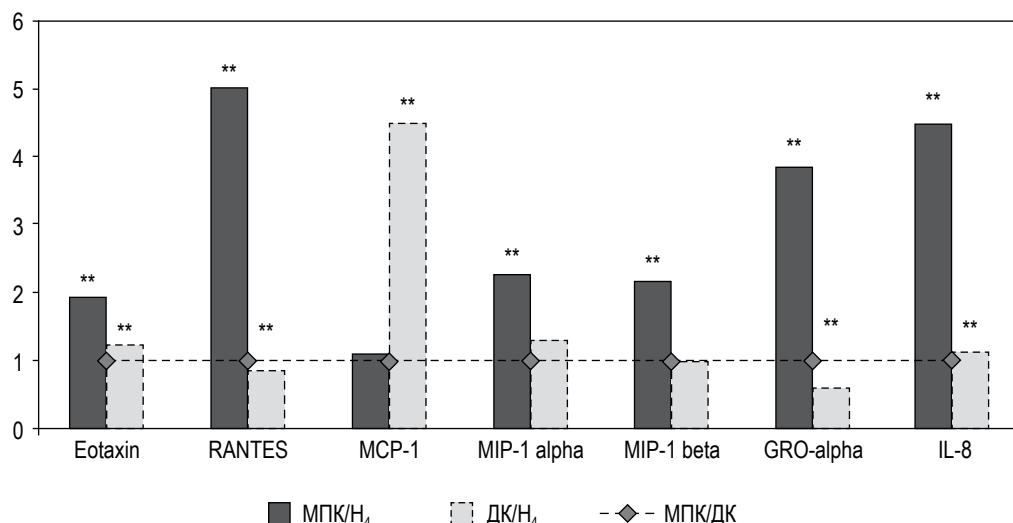


Рисунок 1. Влияние блокады Н_{3/4}-рецепторов МПК и ДК на синтез хемокинов

Примечание. По оси Y: МПК/ДК – концентрация хемокинов в спонтанных культурах МПК и ДК (контроль);

МПК/Н – концентрация хемокинов после блокады Н_{3/4}-рецепторов МПК;

ДК/Н – концентрация хемокинов после блокады Н_{3/4}-рецепторов ДК;

** – $p < 0,05$ – достоверность различий между контролем и опытной группой (культивированных в присутствии ципроксифана МПК и ДК).

на секрецию цитокиновых/хемокиновых факторов, участвующих в воспалительных процессах не только при аллергических реакциях, но и при других патологических процессах, индуцируемых гистамином.

В представленном исследовании установлено, что блокада гистаминовых рецепторов МПК антагонистом Н_{3/4}-рецепторов Ципроксифаном способствует выраженному росту продукции Eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , GRO- α и IL-8. Вместе с тем блокада рецепторов мало влияет на синтез MCP-1. Блокада рецепторов сопровождается, как известно, изменениями экспрессии специфических связывающих структур CCR2, CCR3, CCR5 (Eotaxin), CCR5 (RANTES), CCR1, CCR5 (MIP-1 α , MIP-1 β) и CCR2 (MCP-1) к хемокинам [16]. Можно предположить, что, в отличие от блокады, активация Н₄-рецепторов МПК должна способствовать торможению секреции Eotaxin, RANTES, MIP-1 α , MIP-1 β , GRO- α и IL-8, что будет вызывать *in vivo* подавление либо ограничение миграции циркулирующих клеточных субпопуляций в очаги иммунного ответа с уменьшением воспалительных изменений в тканях.

Ранее проведенные исследования показали, что обработанные гистамином незрелые ДК не проявляют полностью зрелый фенотип, т.к. могут не экспрессировать хемокиновые рецепторы CCR5, CCR7 и CXCR4 *de novo* [6]. Поэтому в культурах ДК нет подобного МПК одностороннего эффекта функциональных изменений

Н₄-рецепторов на секрецию большинства хемокинов. Однако ДК под влиянием блокады Н_{3/4} гистаминовых рецепторов активнее секретируют MCP-1 (CCL2-лиганда), который вовлечен в процессы регуляции миграции моноцитов, и ДК, вероятно, играют важную роль в поляризации Th0 в Th2. Имеются основания предположить, что активация Н₄-рецепторов будет вызывать супрессию секреции MCP-1, а также (в меньшей степени) Eotaxin, GRO- α и IL-8. Последнее является одним из вероятных механизмов торможения гистаминовой регуляции процессов сенсibilизации, миграции различных эффекторных клеток в очаги воспаления, что обуславливает в конечном итоге поляризацию Th0 в Th1. В качестве подтверждения этого вывода нами отмечено, что под влиянием блокады гистаминовых Н_{3/4}-рецепторов ДК наблюдается повышение секреции RANTES, который, являясь лигандом CCR5, наряду с другими хемокинами СС-семейства реализует влияние ДК на созревание Th0 в Th1 субпопуляцию лимфоцитов [17].

В заключение следует отметить, что Ципроксифан, вероятно, вступая во взаимодействие со специфическими Н_{3/4}-рецепторами, приводит к экспрессии других типов гистаминовых рецепторов (в частности Н₁). Сходная ситуация наблюдается при блокаде Н₃-рецепторов коры головного мозга и активации эндогенным гистамином Н₁-рецепторов [16]. В дальнейшем был выявлен синергизм регуляторного действия

H₁- и H₄-агонистов/антагонистов. Кроме того, эти свойства зависят от количества, интенсивности экспрессии типов H-рецепторов и различиях в способности связывать гистамин [20]. Подобные результаты во многом объясняют разнонаправленный результат влияния Ципроксифана на секрецию МПК и ДК хемокинов.

Таким образом, не только H₁/H₂-типы гистаминовых рецепторов, но и H₃/H₄-рецепторы могут быть вовлечены в секрецию хемокинов Eotaxin, RANTES, MCP-1, MIP-1α, MIP-1β, GRO-α и IL-8, регулирующих миграцию клеток в очаги иммунологических реакций и процессы тканевого ремоделирования.

Список литературы / References

1. Ханферьян Р.А., Мильченко Н.О., Солнцева Т.Н., Габуева Ж.В., Раджабканиев Р.М. Роль гистаминергической системы в регуляции питания // Вопросы питания, 2013. Т. 82, № 3. С. 4-10. [Khanferyan R.A., Milchenko N.O., Solntseva T.N., Gabueva Zh.V., Radzhabkadiyev P.M. Role of histaminergic system in the regulation of nutrition. *Voprosy pitaniya = Problems of Nutrition*, 2013, Vol. 82, no. 3, pp. 4-10. (In Russ.)]
2. Akdis C.A., Blaser K. Mechanisms of specific immunotherapy: current knowledge. *Arb Paul Ehrlich Inst Bundesamt Sera Impfstoffe Frankf A M*, 2003, Vol. 94, pp. 219-227, discussion 227-228.
3. Akdis C.A., Simons F.E. Histamine receptors are hot in immunopharmacology. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, Vol. 533, pp. 69-76.
4. Akdis C.A. Immune Regulation by Histamine H4 Receptors in Skin. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008, Vol. 128, pp. 1615-1616.
5. Byron J.W. Mechanism for histamine H2-receptor induced cell-cycle changes in the bone marrow stem cell. *Agents Actions*, 1977, Vol. 7, no. 2, pp. 209-213.
6. Caron G., Delneste Y., Roelandts E., Duez C., Herbault N., Magistrelli G., Bonnefoy J.Y., Pestel J., Jeannin P. Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 10, pp. 6000-6006.
7. Caron G., Delneste Y., Roelandts E., Duez C., Bonnefoy J.Y., Pestel J., Jeannin P. Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 7, pp. 3682-3686.
8. Gbahou F., Vincent L., Humbert-Claude M., Tardivel-Lacombe J., Chabret C., Arrang J.M. Compared pharmacology of human histamine H3 and H4 receptors: structure-activity relationships of histamine derivatives. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, Vol. 147, no. 7, pp. 744-754.
9. Gutzmer R., Langer K., Lisewski M., Mommert S., Rieckborn D., Kapp A., Werfel T. Expression and function of histamine receptors 1 and 2 on human monocyte-derived dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 109, no. 3, pp. 524-531.
10. Huang J.F., Thurmond R.L. The new biology of histamine receptors. *Curr. Allergy Asthma Rep.*, 2008, Vol. 8, no. 1, pp. 21-27.
11. Idzko M., la Sala A., Ferrari D., Panther E., Herouy Y., Dichmann S., Mockenhaupt M., Di Virgilio F., Girolomoni G., Norgauer J. Expression and function of histamine receptors in human monocyte-derived dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2002, Vol. 109, no. 5, pp. 839-846.
12. Jutel M., Watanabe T., Akdis M., Blaser K., Akdis C.A. Immune regulation by histamine. *Curr. Opin. Immunol.*, 2002, Vol. 14, no. 6, pp. 735-740.
13. Mazzoni A., Young H.A., Spitzer J.H., Visintin A., Segal D.M. Histamine regulates cytokine production in maturing dendritic cells, resulting in altered T cell polarization. *J. Clin. Invest.*, 2001, Vol. 108, no. 12, pp. 1865-1873.
14. Merad M., Manz M.G. Dendritic cell homeostasis. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 15, pp. 3418-3427.
15. Merad M., Sathe P., Helft J., Miller J., Mortha A. The dendritic cell lineage: ontogeny and function of dendritic cells and their subsets in the steady state and the inflamed setting. *Annu Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 31, pp. 563-604.
16. Parmentier R., Anacleto C., Guhenne C., Brousseau E., Bricout D., Giboulot T., Bozyczko-Coyne D., Spiegel K., Ohtsu H., Williams M., Lin J.S. The brain H3-receptor as a novel therapeutic target for vigilance and sleep-wake disorders. *Biochem. Pharmacol. (April 2007)*, Vol. 73, no. 8, pp. 1157-1171.
17. Satish L. Deshmane, Sergey Kremlev, Shohreh Amini, and Bassel E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2009, Vol. 29, no. 6, pp. 313-326.
18. Schneider E., Bertron A.F., Dy M. Modulation of hematopoiesis through histamine receptor signaling. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, Vol. 3, pp. 467-473.
19. Sasano M., Goto M., Nishioka K. Production of prostaglandin E2 induced by histamine by cloned rheumatoid synovial cells. *Ann Rheum Dis.*, 1990, Vol. 49, no. 7, pp. 504-506.

20. Seifert R., Schneider E.H., Dove S., Brunskole I., Neumann D., Strasser A., Buschauer A. Paradoxical stimulatory effects of the "standard" histamine H4-receptor antagonist JNJ777120: the H4 receptor joins the club of 7 transmembrane domain receptors exhibiting functional selectivity. *Mol. Pharmacol.*, 2011, Vol. 79, no. 4, pp. 631-638.

21. Szeberényi J.B., Pállinger E., Zsinkó M., Pós Z., Rothe G., Orsó E., Szeberényi S., Schmitz G., Falus A., László V. Inhibition of effects of endogenously synthesized histamine disturbs in vitro human dendritic cell differentiation. *Immunol. Lett.*, 2001, Vol. 76, no. 3, pp. 175-182.

22. Thurmond R.L., Gelfand E.W., Dunford P.J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: the search for new antihistamines. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, Vol. 7, pp. 41-53.

23. Zhang M., Venable J.D., Thurmond R.L. The histamine H4 receptor in autoimmune disease. *Expert Opin. Investig. Drugs*, 2006, Vol. 15, no. 11, pp. 1443-1452.

Авторы:

Евстратова В.С. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

Ригер Н.А. — д.м.н., старший научный сотрудник лаборатории иммунологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

Никитюк Д.Б. — д.м.н., профессор, врио директора ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Москва, Россия

Ханферьян Р.А. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии ФГБУН «Федеральный исследовательский центр питания, биотехнологии и безопасности пищи», Россия

Authors:

Evstratova V.S., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Riger N.A., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Nikityuk D.B., PhD, MD (Medicine), Professor, Acting Director, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Khanferyan R.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunology, Federal Research Center of Nutrition and Biotechnology, Moscow, Russian Federation

Поступила 29.02.2016

Отправлена на доработку 26.05.2016

Принята к печати 14.07.2016

Received 29.02.2016

Revision received 26.05.2016

Accepted 14.07.2016

IL-12p70, IFN γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF α , IL-8, MCP-1, MIP-1 β were measured in nasal secretions. In remission state, the children with combined forms of respiratory allergy to pollen allergens showed local signs of chronic inflammatory process (in the nasal mucosa) associated with disturbed immune response, with increased synthesis of proinflammatory cytokines and decreased production anti-inflammatory cytokines, as well as enhanced reactions aimed for allergen elimination. Following clinical success of sublingual immunotherapy, we have shown a reduction in immunological imbalance, due to decreased activity of the systems modulating severity of inflammation and production of pro-inflammatory cytokines.

Keywords: cytokines, cytokines ratio indexes, allergen-specific immunotherapy, hay fever

Введение

В последние десятилетия внимание многих исследователей обращено на изучение иммунологических реакций, происходящих на местном и системном уровне при аллергических заболеваниях. Изучались иммунные изменения, происходящие на различных стадиях аллергического процесса [2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15], выявлено наличие персистирующего воспаления, даже при отсутствии клинических симптомов в периоде ремиссии АЗ [2, 4, 14, 16]. Исследовались иммунологические реакции, происходящие при различных способах лечебного воздействия [1, 2, 8, 9, 17, 18], в том числе при подкожной [19] и сублингвальной [1, 17] аллергенспецифической иммунотерапии как наиболее эффективном патогенетическом методе лечения АЗ. Тем не менее на сегодняшний день остаются недостаточно изученными механизмы иммунопатогенеза АЗ, протекающих в виде сочетания нескольких нозологических форм, и особенности взаимодействия ЦК в системе цитокиновой сети при сочетанных вариантах аллергопатологии, что является важным моментом для большего понимания иммунологических изменений и выбора оптимальных методов лечебного воздействия.

Цель исследования: изучить содержание G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, IFN γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF α , IL-8, MCP-1, MIP-1 β в назальном секрете у детей с сочетанными формами респираторной пыльцевой аллергии, вызванной пылью деревьев, в периоде ремиссии АЗ до и после проведения 3 курсов СЛИТ.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 20 детей в возрасте $11,8 \pm 0,7$ лет с сочетанными формами поллиноза, вызванного пылью деревьев, получивших 3 курса СЛИТ препаратом Сталораль «Пыльца березы» по предсезонно-сезонной схеме с хорошей клинической эффективностью (суммарная курсовая доза препарата — 36930 ИР, что эквивалентно 18465 мкг аллергена березы rBet v 1). Группу сравнения составили 20 детей в возрасте $9,1 \pm 1,2$ лет с сочетанными формами поллиноза, не получавших АСИТ, контрольную группу —

20 детей в возрасте $14,6 \pm 1,1$ лет без аллергических проявлений и отягощенного семейного анамнеза по аллергопатологии. При анализе нозологической структуры вариантов течения поллиноза в группах детей с АЗ достоверных различий не выявлено ($p > 0,05$): 70,0% детей ($n = 14$) в основной группе и в группе сравнения имели сочетание аллергического риноконъюнктивита (АРК) с бронхиальной астмой (БА). Сочетание АРК с БА и атопическим дерматитом (АД) имели 15,0% ($n = 3$) детей в основной и 20,0% ($n = 4$) в группе сравнения, сочетание АРК с гиперреактивностью дыхательных путей имели 15,0% ($n = 3$) в основной и 10,0% ($n = 2$) в группе сравнения.

Во всех группах в назальном секрете исследовали 17 цитокинов на фоне отсутствия признаков обострения АЗ и отсутствия признаков воспалительного процесса. Назальный секрет для исследования собирали на смоченный изотоническим раствором 0,9% NaCl ватный тупфер, который помещали в средний носовой ход на 30 секунд, затем ватку переносили в пластиковую микропробирку с физиологическим раствором в объеме 0,75 мл и замораживали при температуре -20° . Перед исследованием производили быстрое размораживание. Пробирки центрифугировали в течение 10 минут при 1500 оборотов/минуту, в дальнейшем работали с надосадочной жидкостью.

Уровень ЦК в назальном секрете определяли на приборе MAGPIX-100 (USA) с использованием системы мультиплексного анализа Bio-Plex компании Bio-Rad (USA) для определения 17 цитокинов (G-CSF, GM-CSF, IL-10, IL-12p70, IFN γ , IL-13, IL-17A, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, TNF α , IL-8, MCP-1, MIP-1 β). Полученные результаты округляли до 0,01 пкг/мл. Количество белка в назальном секрете определяли пирогалловым методом. В дальнейшем показатели ЦК переводили в мкг/г белка, что, по нашему мнению, позволило оценить истинную концентрацию исследуемых ЦК в назальном секрете. Подсчитывались индивидуальные значения индексов соотношения цитокинов с последующим расчетом средних показателей.

Полученные данные обработаны непараметрическими методами с помощью критерия

Манна–Уитни с вычислением средней арифметической и ее ошибки ($M \pm m$). Различия между группами считались достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При исследовании ЦК в пг/мл в назальном секрете у детей с поллинозом, не получивших АСИТ, было отмечено значительное повышение уровня провоспалительного IL-1 β в сравнении с показателями основной группы (после 3 курсов СЛИТ) и группой условно здоровых детей – $90,28 \pm 27,62$ в сравнении с $59,37 \pm 7,94$ ($p < 0,05$) и $55,09 \pm 16,64$ ($p < 0,05$) (табл. 1). Кроме того, у детей с сочетанными формами поллиноза, не получивших ИТ, отмечены значительно более высокие показатели MIP-1 β (хемоаттрактант для мононуклеаров) и IL-5 (эозинофильный колониестимулирующий фактор) в сравнении с группой детей без АЗ: соответственно, $278,26 \pm 78,31$ в сравнении с $161,21 \pm 31,84$ ($p < 0,05$) и $2,14 \pm 0,58$ в сравнении с $0,81 \pm 0,13$ ($p < 0,05$). Тогда как уровни MIP-1 β и IL-5 не различались у детей, получивших 3 курса СЛИТ, и условно здоровых детей.

При исследовании ЦК в назальном секрете у детей в основной и в группе сравнения (без АСИТ) в пг/мл было отмечено значительное

($p < 0,05$) повышение провоспалительных IL-7 и IL-13 в сравнении с группой условно здоровых детей (без АЗ) – $11,61 \pm 1,32$ и $9,81 \pm 0,8$ в сравнении с $6,36 \pm 0,61$ и $2,59 \pm 0,39$ и $2,75 \pm 0,52$ в сравнении с $1,34 \pm 0,21$ соответственно. IL-7 – провоспалительный ЦК, вырабатываемый Т-лимфоцитами, фибробластами и клетками, обладающий эффектом ростового фактора для незрелых Т- и В-лимфоцитов. IL-13 – ЦК, секретируемый тучными клетками и Th2-лимфоцитами, участвует в индукции синтеза хемокинов и увеличении экспрессии молекул адгезии, стимулирует синтез IgE, вызывает индукцию бронхиальной гиперреактивности и гиперсекрецию слизи, а также активацию и миграцию эозинофилов в очаг воспаления [6–10]. Кроме того, у детей с поллинозом после 3 курсов СЛИТ, как и у детей, не получивших АСИТ, в сравнении с группой условно здоровых детей в пг/мл отмечено значительно более высокое содержание в назальном секрете хемокина IL-8 (специфический хемоаттрактант для нейтрофилов) – $1280,31 \pm 126,53$ и $1301,87 \pm 251,99$ в сравнении с $847,75 \pm 127,63$ ($p < 0,05$), ростовых факторов G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор) – $323,46 \pm 66,98$ и $400,98 \pm 177,53$ в сравнении с $168,87 \pm 42,65$ ($p < 0,05$) и GM-CSF (гранулоци-

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В НАЗАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ У ДЕТЕЙ С СОЧЕТАННЫМИ ФОРМАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИИ ДО И ПОСЛЕ ТРЕХ КУРСОВ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ, $M \pm m$, пг/мл

Цитокины	Без АСИТ, n = 20	Сталораль, n = 20	Без АЗ, n = 20
Провоспалительные			
IL-1 β	$90,28 \pm 27,62^*$	$59,37 \pm 7,94^{**}$	$55,09 \pm 16,64$
IL-2	$2,5 \pm 0,48$	$1,91 \pm 0,25$	$3,2 \pm 0,61$
IL-4	$0,66 \pm 0,08$	$0,61 \pm 0,05$	$0,61 \pm 0,08$
IL-6	$11,22 \pm 2,2^*$	$11,61 \pm 1,32^*$	$36,92 \pm 13,24$
IL-7	$9,81 \pm 0,8^*$	$11,61 \pm 1,32^*$	$6,36 \pm 0,61$
IL-12p70	$11,74 \pm 1,68$	$11,58 \pm 1,28$	$10,85 \pm 1,37$
IL-13	$2,75 \pm 0,52^*$	$2,59 \pm 0,39^*$	$1,34 \pm 0,21$
IL-17A	$38,77 \pm 10,15$	$24,15 \pm 2,01$	$28,79 \pm 4,85$
IFN γ	$45,01 \pm 7,09$	$36,34 \pm 3,06$	$38,1 \pm 5,62$
TNF α	$6,56 \pm 1,1$	$5,1 \pm 0,48$	$6,35 \pm 1,34$
Противовоспалительные			
IL-10	$3,2 \pm 0,29$	$3,35 \pm 0,27$	$3,15 \pm 0,40$
Хемокины			
IL-8	$1301,87 \pm 251,99^*$	$1280,31 \pm 126,53^*$	$847,75 \pm 127,63$
MCP-1	$12,08 \pm 1,15^*$	$11,43 \pm 0,91^*$	$23,83 \pm 6,3$
MIP-1 β	$278,26 \pm 78,31^*$	$185,53 \pm 28,86$	$161,21 \pm 31,84$
Ростовые факторы			
IL-5	$2,14 \pm 0,58^*$	$0,97 \pm 0,14$	$0,81 \pm 0,13$
G-CSF	$400,98 \pm 177,53^*$	$323,46 \pm 66,98^*$	$168,87 \pm 42,65$
GM-CSF	$105,83 \pm 7,97^*$	$105,2 \pm 7,56^*$	$45,01 \pm 7,1$

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с группой без АЗ; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой без АСИТ.

тарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) – $105,2 \pm 7,56$ и $105,83 \pm 7,97$ в сравнении с $45,01 \pm 7,1$ ($p < 0,05$) на фоне снижения провоспалительного IL-6 – $11,61 \pm 1,32$ и $11,22 \pm 2,2$ в сравнении с $36,92 \pm 13,24$ ($p < 0,05$), а также хемокина MCP-1 (специфический хемоаттрактант для моноцитов) – $11,43 \pm 0,91$ и $12,08 \pm 1,15$ в сравнении с $23,83 \pm 6,3$ ($p < 0,05$). IL-6 синтезируется активированными макрофагами и Т-лимфоцитами, участвует в активации пролиферации и дифференцировке В- и Т-лимфоцитов, является медиатором острой фазы воспаления [2, 7, 9, 15].

При исследовании уровней ЦК в пересчете в мкг/г белка у детей в основной группе и детей в группе сравнения отмечено значительно ($p < 0,05$) более низкое содержание провоспалительного IL-2 и противовоспалительного IL-10 в сравнении с группой детей, не имеющих АЗ: соответственно, $0,08 \pm 0,018$ и $0,054 \pm 0,009$ в сравнении с $0,16 \pm 0,04$, и $0,11 \pm 0,014$ и $0,18 \pm 0,047$ в сравнении с $0,38 \pm 0,053$ (табл. 2). IL-2 синтезируется активированными Th1, участвует в неспецифической пролиферации и активации Т- и В-лимфоцитов, индукции синтеза IFN γ , IL-6 и IL-8. IL-10 – ЦК, вырабатываемый преимущественно Th2-лимфоцитами, опреде-

ляет направленность иммунного ответа, обладает противовоспалительным эффектом через активацию Treg и подавление функциональной активности макрофагов, дендритных и тучных клеток, участвующих в аллергическом воспалительном процессе. В представленной литературе имеются данные о наличии корреляционной зависимости между уровнем снижения IL-10 и тяжестью симптомов АЗ [2, 7, 15].

В назальном секрете детей, получивших 3 курса СЛИТ, в сравнении с детьми, не получившими АСИТ, и условно здоровыми детьми при расчете в мкг/г белка отмечен значительно более высокий уровень IL-7 – $0,43 \pm 0,066$ в сравнении с $0,33 \pm 0,048$ и $0,31 \pm 0,045$, $p < 0,05$ и низкий уровень GM-CSF – $3,76 \pm 0,47$ в сравнении с $4,07 \pm 0,47$ и $5,06 \pm 0,41$, $p < 0,05$.

У детей в основной группе в сравнении с группой детей без ИТ при исследовании в мкг/г белка выявлены значительно более низкие уровни провоспалительного IL-17 – $0,90 \pm 0,13$ и $1,35 \pm 0,20$ ($p < 0,05$), хемокина MIP-1 β – $6,84 \pm 1,26$ и $10,69 \pm 1,82$ ($p < 0,05$) и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора G-CSF – $9,93 \pm 1,67$ и $16,01 \pm 3,86$ ($p < 0,05$). Между тем, при сравнении уровней IL-17, MIP-1 β и G-CSF в назальном

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В НАЗАЛЬНОМ СЕКРЕТЕ У ДЕТЕЙ С СОЧЕТАННЫМИ ФОРМАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИИ ДО И ПОСЛЕ ТРЕХ КУРСОВ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ, М $\pm$ м, мкг/г БЕЛКА

Цитокины	Без АСИТ, n = 20	Сталораль, n = 20	Без АЗ, n = 20
Провоспалительные			
IL-1 β	$3,01 \pm 0,51$	$2,17 \pm 0,37$	$2,99 \pm 1,26$
IL-2	$0,054 \pm 0,009^*$	$0,08 \pm 0,018^*$	$0,16 \pm 0,04$
IL-4	$0,023 \pm 0,002$	$0,023 \pm 0,003$	$0,033 \pm 0,007$
IL-6	$0,28 \pm 0,048$	$0,42 \pm 0,088$	$1,98 \pm 0,847$
IL-7	$0,33 \pm 0,048$	$0,43 \pm 0,066^{***}$	$0,31 \pm 0,045$
IL-12p70	$0,39 \pm 0,053$	$0,42 \pm 0,064$	$0,56 \pm 0,11$
IL-13	$0,084 \pm 0,009$	$0,087 \pm 0,014$	$0,066 \pm 0,012$
IL-17A	$1,35 \pm 0,20$	$0,90 \pm 0,13^{**}$	$1,48 \pm 0,42$
IFN γ	$1,59 \pm 0,15$	$1,32 \pm 0,18$	$1,93 \pm 0,42$
TNF α	$0,208 \pm 0,02$	$0,195 \pm 0,027$	$0,33 \pm 0,104$
Противовоспалительные			
IL-10	$0,18 \pm 0,047^*$	$0,11 \pm 0,014^*$	$0,38 \pm 0,053$
Хемокины			
IL-8	$42,87 \pm 6,18$	$50,57 \pm 7,20$	$38,8 \pm 7,06$
MCP-1	$0,42 \pm 0,032$	$0,44 \pm 0,082$	$1,30 \pm 0,49$
MIP-1 β	$10,69 \pm 1,82$	$6,84 \pm 1,26^{**}$	$8,27 \pm 2,41$
Ростовые факторы			
IL-5	$0,043 \pm 0,01$	$0,033 \pm 0,007$	$0,038 \pm 0,004$
G-CSF	$16,01 \pm 3,86^*$	$9,93 \pm 1,67^{**}$	$8,59 \pm 3,35$
GM-CSF	$4,07 \pm 0,47^*$	$3,76 \pm 0,47^{***}$	$5,06 \pm 0,41$

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с группой без АЗ; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой без АСИТ.

секрете у детей, получивших 3 курса СЛИТ, с соответствующими показателями в группе условно здоровых детей достоверных различий не отмечено.

Таким образом, дети с сочетанными формами респираторной пылевой аллергии, получившие 3 курса эффективной СЛИТ и не получившие АСИТ, в назальном секрете имели повышение уровней ЦК, выполняющих функции провоспалительных (IL-7, IL-13), функции хемотаксиса (IL-8) и функции ростовых факторов (G-CSF и GM-CSF) на фоне снижения уровня провоспалительного IL-6 и хемокина MCP-1 — в сравнении с детьми без АЗ при исследовании в пг/мл. При расчете в мкг/г белка у детей с сочетанными формами поллиноза до и после 3 курсов АСИТ отмечено снижение уровней IL-2 и IL-10 в сравнении с детьми, не имевшими АЗ, что соответствует имеющимся литературным данным об уровне указанных ЦК при АЗ [2, 7, 15].

У детей с сочетанными формами поллиноза, не получивших АСИТ, при исследовании в пг/мл отмечены более высокие уровни IL-1β — в сравнении с детьми, получившими 3 курса СЛИТ, и условно здоровыми детьми, а также MIP-1β и IL-5 — в сравнении с группой детей без АЗ.

При исследовании ЦК в назальном секрете в мкг/г белка у детей с сочетанными формами

респираторной аллергии, получивших 3 курса СЛИТ, отмечено повышение уровня провоспалительного IL-7 на фоне снижения GM-CSF — в сравнении с детьми без АСИТ и условно здоровыми детьми, а также снижение уровней IL-17, MIP-1β и G-CSF — в сравнении с группой детей, не получивших АСИТ.

Выявленные изменения свидетельствуют о наличии персистирующего воспаления в слизистой носа у детей с сочетанными формами респираторной пылевой аллергии в периоде ремиссии при отсутствии аллергенной стимуляции. Дети, не получившие АСИТ, имеют более высокие уровни ЦК, участвующих в развитии неспецифического воспалительного процесса в сравнении с детьми, получившими 3 курса клинически эффективной СЛИТ.

При исследовании индексов соотношения ЦК в пг/мл у детей с сочетанными формами поллиноза до и после 3 курсов АСИТ в сравнении с показателями условно здоровых детей отмечены достоверно ($p < 0,05$) более высокие показатели IL-1β/IFNγ, IL-1β/IL-4, IL-1β/IL-10, IL-1β/IL-12, а также IL-8/IFNγ, IL-8/IL-4, IL-8/IL-10 (табл. 3).

В основной группе в сравнении с группой условно здоровых детей отмечен значительно более низкий показатель IL-17A/IFNγ — $0,68 \pm 0,037$

ТАБЛИЦА 3. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДЕКСОВ СООТНОШЕНИЯ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С СОЧЕТАННЫМИ ФОРМАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПЫЛЕВОЙ АЛЛЕРГИИ ДО И ПОСЛЕ ТРЕХ КУРСОВ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ, $M \pm m$, пг/мл

Соотношение ЦК	Без АСИТ, n = 20	Сталораль, n = 20	Без АЗ, n = 20
IL-4/IFNγ	0,016±0,0007	0,018±0,0011	0,018±0,0018
IL-17A/IFNγ	0,83±0,081	0,68±0,037*	0,79±0,074
IL-1β/IFNγ	1,82±0,47*	1,675±0,3*	0,87±0,16
IL-8/IFNγ	30,3±4,5*	39,07±3,73*	23,31±1,77
MIP-1β/IFNγ	5,67±0,65*	4,97±0,56	4,06±0,58
IL-1β/IL-4	137,22±45,64*	111,58±18,25*	55,59±9,88
IL-8/IL-4	1920,7±260,2*	2248,2±183,3*	1395,2±106,8
MIP-1β/IL-4	371,7±47,4*	288,2±28,96**	214,3±21,3
IL-4/IL-10	0,214±0,014	0,199±0,023	0,202±0,014
IFNγ/IL-10	13,92±1,08	11,36±1,09	12,36±1,08
IL-1β/IL-10	27,36±7,66*	17,55±2,03*	12,45±1,91
IL-8/IL-10	439,19±84,89*	444,2±57,7*	305,77±35,93
MIP-1β/IL-10	83,25±15,39*	56,74±6,72	45,52±4,63
IL-4/IL-12	0,061±0,004	0,063±0,0038	0,054±0,0036
IFNγ/IL-12	4,12±0,47	3,69±0,30	3,45±0,37
IL-1β/IL-12	11,17±5,33*	7,73±1,76*	3,36±0,53
IL-8/IL-12	120,15±20,8	152,85±21,92*	84,12±11,09
MIP-1β/IL-12	21,27±2,82*	16,87±1,29**	11,76±1,82
IL-4/IL-17A	0,023±0,0024	0,028±0,0016	0,025±0,0023

Примечание. * — $p < 0,05$ в сравнении с группой без АЗ; ** — $p < 0,05$ в сравнении с группой без АСИТ.

ТАБЛИЦА 4. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИНДЕКСОВ СООТНОШЕНИЯ ЦИТОКИНОВ У ДЕТЕЙ С СОЧЕТАНЫМИ ФОРМАМИ РЕСПИРАТОРНОЙ ПЫЛЬЦЕВОЙ АЛЛЕРГИИ ДО И ПОСЛЕ ТРЕХ КУРСОВ СУБЛИНГВАЛЬНОЙ ИММУНОТЕРАПИИ, $M \pm m$, мкг/г БЕЛКА

Соотношение ЦК	Без АСИТ, n = 20	Сталораль, n = 20	Без АЗ, n = 20
IL-4/IFN γ	0,016 $\pm$ 0,0018	0,018 $\pm$ 0,0012	0,022 $\pm$ 0,0025
IL-17A/IFN γ	0,83 $\pm$ 0,081	0,68 $\pm$ 0,031	0,79 $\pm$ 0,061
IL-1 β /IFN γ	1,82 $\pm$ 0,47*	1,85 $\pm$ 0,29*	0,86 $\pm$ 0,13
IL-8/IFN γ	30,4 $\pm$ 4,51*	38,97 $\pm$ 4,01*	23,29 $\pm$ 1,92
MIP-1 β /IFN γ	5,71 $\pm$ 0,66*	4,96 $\pm$ 0,48*	4,06 $\pm$ 0,54
IL-1 β /IL-4	95,91 $\pm$ 26,98*	84,47 $\pm$ 13,69*	48,24 $\pm$ 8,64
IL-8/IL-4	1352,2 $\pm$ 195,8	1856,1 $\pm$ 190,1***	1217,7 $\pm$ 129,5
MIP-1 β /IL-4	320,7 $\pm$ 52,48*	211,1 $\pm$ 35,9	224,8 $\pm$ 22,3
IL-4/IL-10	0,2 $\pm$ 0,027*	0,197 $\pm$ 0,016*	0,298 $\pm$ 0,041
IFN γ /IL-10	12,24 $\pm$ 0,97	11,33 $\pm$ 1,07	13,09 $\pm$ 0,99
IL-1 β /IL-10	24,43 $\pm$ 8,23	17,59 $\pm$ 2,06	13,9 $\pm$ 2,28
IL-8/IL-10	396,56 $\pm$ 87,9	442,3 $\pm$ 56,56	337,88 $\pm$ 42,92
MIP-1 β /IL-10	67,71 $\pm$ 11,63*	56,91 $\pm$ 6,79	48,09 $\pm$ 4,88
IL-4/IL-12	0,066 $\pm$ 0,01	0,062 $\pm$ 0,006	0,065 $\pm$ 0,007
IFN γ /IL-12	4,04 $\pm$ 0,44	3,73 $\pm$ 0,31	3,46 $\pm$ 0,27
IL-1 β /IL-12	10,63 $\pm$ 4,93*	7,85 $\pm$ 1,77*	3,38 $\pm$ 0,53
IL-8/IL-12	118,59 $\pm$ 20,3	154,88 $\pm$ 21,89*	84,62 $\pm$ 9,87
MIP-1 β /IL-12	21,05 $\pm$ 2,69*	17,06 $\pm$ 1,44*	11,41 $\pm$ 1,06
IL-4/IL-17A	0,026 $\pm$ 0,005*	0,027 $\pm$ 0,002*	0,077 $\pm$ 0,019

Примечание. * – $p < 0,05$ в сравнении с группой без АЗ; ** – $p < 0,05$ в сравнении с группой без АСИТ.

и 0,79 $\pm$ 0,074 ($p < 0,05$) и более высокий IL-8/IL-12 – 152,85 $\pm$ 21,92 и 84,12 $\pm$ 11,09 ($p < 0,05$). Отмечены однонаправленные изменения показателей MIP-1 β /IL-4 и MIP-1 β /IL-12 при расчете в пг/мл – в группе детей, получивших три курса СЛИТ, эти показатели были достоверно ниже показателей детей без АСИТ, но значительно больше показателей условно здоровых детей.

При исследовании индексов соотношения ЦК в пересчете на мкг/г белка у детей с сочетанными формами поллиноза до и после трех курсов СЛИТ отмечены достоверно ($p < 0,05$) более высокие показатели соотношений IL-1 β /IFN γ , IL-1 β /IL-4, IL-1 β /IL-12, IL-8/IFN γ , MIP-1 β /IFN γ и MIP-1 β /IL-12 на фоне значительного ($p < 0,05$) снижения показателей IL-4/IL-10 и IL-4/IL-17A – в сравнении с детьми, не имеющими АЗ (табл. 4).

В основной группе детей отмечен достоверно ($p < 0,05$) более высокий показатель IL-8/IL-4 в сравнении с детьми, не получившими ИТ, и условно здоровыми детьми – 1856,1 $\pm$ 190,1 в сравнении с 1352,2 $\pm$ 195,8 и 1217,7 $\pm$ 129,5, а также

более высокий показатель IL-8/IL-12 в сравнении с детьми без АЗ – 154,88 $\pm$ 21,89 и 84,62 $\pm$ 9,87; $p < 0,05$.

Заключение

Таким образом, у детей с сочетанными формами респираторной пыльцевой аллергии на уровне местного эпитопа (в слизистой оболочке носа) в периоде ремиссии АЗ в отсутствие антигенной стимуляции причинно-значимым аллергеном отмечаются признаки хронического воспалительного процесса с нарушением иммунного ответа за счет увеличения синтеза про- и снижения выработки противовоспалительных ЦК, а также усилением реакций, направленных на элиминацию аллергена. После проведения трех курсов клинически эффективной сублингвальной иммунотерапии причинно-значимым аллергеном выявлено снижение иммунологического дисбаланса за счет снижения активности систем, регулирующих выраженность воспалительного процесса и выработку провоспалительных цитокинов.

Список литературы / References

1. Гайдук И.М., Коростовцев Д.С., Шапорова Н.Л., Брейкин Д.В., Трусова О.В., Камаева И.А. Изменения иммунологических показателей при проведении сублингвальной аллерген-специфической иммунотерапии у детей с поллинозом // Медицинская иммунология, 2013, Т. 15, № 1. С. 51-54. [Gaiduk I.M., Korostovtsev D.S., Shapорова N.L., Breykin D.V., Trusov O.V., Kamaeva I.A. Changes in immunological parameters during sublingual

allergen-specific immunotherapy in children with hay fever. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2013, Vol. 15, no. 1, pp. 51-54. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2013-1-51-54>

2. Гушин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. М.: Фармарус Принт, 1998. 252 с. [Gushin I.S. Allergic inflammation and pharmacological control]. Moscow: Farmarus Print, 1998. 252 p.

3. Зурочка А.В., Шестакова Е.В., Квятковская С.В., Дворчик Е.Е. Оценка иммунного статуса и продукции цитокинов у больных атопической и смешанной бронхиальной астмой // Медицинская иммунология, 2009. № 2-3. С. 279-286. [Zurochka A.V., Shestakova E.V., Kvyatkovskaya S.V., Dvorchik E.E. Evaluation of the immune status and cytokine production in patients with atopic and mixed asthma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, no. 2-3, pp. 279-286. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2009-2-3-279-286>

4. Зурочка А.В., Долгушин И.И., Квятковская С.В., Рябова Л.В. Латентная сенсibilизация. Челябинск: Челябинская государственная медицинская академия, 2005. 181 с. [Zurochka A.V., Dolgushin I.I., Kvyatkovskaya S.V., Ryabova L.V. Latent sensitization]. Chelyabinsk: Chelyabinsk State Medical Academy, 2005. 181 p.

5. Иванова Ю.В., Просекова Е.В., Шестовская Т.Н., Деркач В.В., Нетесова С.Ю. Аллергические заболевания у детей: особенности цитокинового и иммунного статуса // Иммунология, 2007. № 3. С. 157-161. Ivanova Yu.V., Prosekov E.V., Shestovskaya T.N., Derkach V.V., Netesova S.Yu. Allergic diseases in children: cytokine and immune status. *Immunologiya = Immunology*, 2007, no. 3, pp. 157-161. (In Russ.)]

6. Иванова Ю.В., Рожка К.Ш., Просекова Е.В., Шестовская Т.Н., Деркач В.В., Нетесова С.Ю., Щеголева О.В. Цитокиновый профиль и динамика синтеза IGE при аллергических заболеваниях у детей // Иммунология, 2010. № 3. С. 140-143. [Ivanova Yu.V., Rozsa K.S., Prosekov E.V., Shestovskaya T.N., Derkach V.V., Netesova S.Yu., Shchegolev O.V. Cytokine profile and dynamics of IGE synthesis in allergic diseases in children. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 3, pp. 140-143. (In Russ.)]

7. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.

8. Просекова Е.В., Деркач В.В., Сабыныч В.А., Шестовская Т.Н., Иванова Ю.В., Нетесова С. Ю. Состояние иммунных и цитокиновых механизмов при аллергических заболеваниях у детей // Тихоокеанский медицинский журнал, 2007. № 2. С. 57-60. [Prosekov E.V., Derkach V.V., Sabynych V.A., Shestovskaya T.N., Ivanova Yu.V., Netesova S.Yu. Condition of immune and cytokine mechanisms at allergic diseases in children. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2007, no. 2, pp. 57-60. (In Russ.)]

9. Просекова Е.В., Деркач В.В., Шестовская Т.Н., Нетесова С.Ю., Иванова Ю.В. Особенности цитокинового профиля и иммунного статуса при аллергических заболеваниях у детей // Тихоокеанский медицинский журнал, 2005. № 3. С. 44-48. [Prosekov E.V., Derkach V.V., Shestovskaya T.N., Netesova S.Yu., Ivanova Yu.V. Features cytokine profile and immune status in allergic diseases in children. *Tikhookeanskiy meditsinskiy zhurnal = Pacific Medical Journal*, 2005, no. 3, pp. 44-48. (In Russ.)]

10. Просекова Е.В., Нетесова С.Ю., Сабыныч В.А., Забелина Н.Р., Щеголева О.В. Клинико-лабораторный алгоритм диагностики аллергического ринита у детей // Дальневосточный медицинский журнал, 2012. № 3. С. 76-79. [Prosekov E.V., Netesova S.Yu., Sabynych V.A., Zabelina N.R., Shchegoleva O.V. Clinical and laboratory diagnosis of allergic rhinitis in children algorithm. *Dalnevostochnyy meditsinskiy zhurnal = Far East Medical Journal*, 2012, no. 3, pp. 76-79. (In Russ.)]

11. Просекова Е.В., Деркач В.В., Шестовская Т.Н., Нетесова С.Ю., Иванова Ю.В. Аллергические заболевания у детей: особенности цитокинового и иммунного статуса // Иммунология, 2007. Т. 28, № 3. С. 157-161. [Prosekov E.V., Derkach V.V., Shestovskaya T.N., Netesova S.Yu., Ivanova Yu.V. Allergic diseases in children: features of cytokine and immune status. *Immunologiya = Immunology*, 2007, Vol. 28, no. 3, pp. 157-161. (In Russ.)]

12. Рябова Л.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В., Черешнев В.А. Особенности иммунологических показателей в зависимости от фазы аллергического ринита // Аллергология и иммунология, 2009. Т. 10, № 4. С. 469-473. [Ryabova L.V., Zurochka A.V., Khaidukov S.V., Chereshevnev V.A. Features immunological parameters depending on the phase of allergic rhinitis. *Allergologiya i immunologiya = Allergy and Immunology*, 2009, Vol. 10, no. 4, pp. 469-473. (In Russ.)]

13. Рябова Л.В., Зурочка А.В. Различия каскада цитокинов у больных бронхиальной астмой в зависимости от стадии течения заболевания // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 4-5. С. 493-498. [Ryabova L.V., Zurochka A.V. Differences cascade of cytokines in patients with bronchial asthma depending on the stage of the disease. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 4-5, pp. 493-498. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2007-4-5-493-498>

14. Рябова Л.В., Зурочка А.В., Хайдуков С.В. Местные и системные механизмы хронического воспаления у больных бронхиальной астмой легкой степени тяжести // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 2-3. С. 169-176. [Ryabova L.V., Zurochka A.V., Khaidukov S.V. Local and systemic mechanisms of chronic inflammation in patients with bronchial asthma mild. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 2-3, pp. 169-176. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2009-2-3-169-176>

15. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Ярилин А.А. Руководство по клинической иммунологии. Диагностика заболеваний иммунной системы. Руководство для врачей. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 352 с. [Khaitov R.M.,

Pinegin B.V., Yarilin A.A. Manual of clinical immunology. Diagnosis of diseases of the immune system. Guidelines for doctors]. Moscow: GEOTAR-Media, 2009. 352 p.

16. Canonica G.W., Compalati E. Minimal persistent inflammation in allergic rhinitis: implications for current treatment strategies. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, Vol. 158, no. 3, pp. 260-271.

17. Novak N., Bieber T., J.-P. Allam. Immunological mechanisms of sublingual allergen-specific immunotherapy. *Allergy*, 2011, Vol. 66, no. 6, pp. 733-739.

18. Okamoto T., Iwata S., Ohnuma K., Dang N.H., Morimoto C. Histamine H1-receptor antagonists with immunomodulating activities: potential use for modulating T helper type 1 (Th1)/Th2 cytokine imbalance and inflammatory responses in allergic diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 2009, Vol. 157, no. 1, pp. 27-34.

19. Shamji M.H., Durham S.R. Mechanisms of immunotherapy to aeroallergens. *Clin. Exp. Allergy*, 2011, Vol. 41, no. 9, pp. 1235-1246.

Авторы:

Емелина Ю.Н. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН; аллерголог-иммунолог поликлиники, Областная детская клиническая больница № 1, г. Екатеринбург, Россия
Зурочка А.В. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, г. Екатеринбург; профессор кафедры «Промышленные биотехнологии» ГБОУ ВПО «Южно-Уральский государственный университет» (Национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Authors:

Emelina Yu.N., Junior Research Associate, Laboratory of Inflammatory Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Clinical Allergologist/Immunologist, Regional Pediatric Clinical Hospital № 1, Ekaterinburg, Russian Federation
Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Laboratory of Inflammatory Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg; Professor, Department of Industrial Biotechnology, South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 06.06.2016
Отправлена на доработку 20.06.2016
Принята к печати 06.07.2016

Received 06.06.2016
Revision received 20.06.2016
Accepted 06.07.2016

ЭКСПРЕССИЯ НЕГАТИВНЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ТРАНСКРИПЦИИ ГЕНОВ В МОНОНУКЛЕАРНЫХ КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Лим В.В., Иванов В.А., Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., 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 60 пациентов с аллергической бронхиальной астмой (АБА) и 41 пациента с неаллергической бронхиальной астмой (НАБА), а также 23 практически здоровых лица. Экспрессию мРНК SOCS5 оценивали путем проведения ПЦР с обратной транскрипцией (RT-PCR).

Полученные данные показывают, что у больных бронхиальной астмой (независимо от клинико-патогенетического варианта) отмечается выраженное повышение уровня экспрессии мРНК SOCS5 по сравнению с контрольной группой (в 1,24 раза и 1,37 раза соответственно), что, по-видимому, является результатом повышения IL-4 и IL-13 сигнализации при бронхиальной астме.

Оценивая полученные данные, можно сделать выводы о том, что повышение экспрессии мРНК SOCS5 у больных БА рассматривается как протективный ответ, направленный против воспалительного процесса. Выявленные нами особенности экспрессии супрессоров цитокиновой сигнализации, вероятно, могут указывать на существование нарушений негативной регуляции клеточной сигнализации у больных бронхиальной астмой.

Полученные данные позволяют рассматривать сложность нарушений регуляции, возникающих на различных уровнях клеточной сигнализации, с позиций полифункциональности молекул семейства негативных регуляторов транскрипции генов SOCS1, SOCS3 и SOCS5, обеспечивающих комплексный контроль цитокиновой сигнализации одновременно в различных сигнальных путях.

Ключевые слова: бронхиальная астма, система SOCS-белков, SOCS3, SOCS5, мононуклеарные клетки

EXPRESSION OF NEGATIVE TRANSCRIPTION REGULATORS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEARS IN PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

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

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

Abstract. Sixty patients with allergic bronchial asthma (ABA) and forty-one, with non-allergic bronchial asthma (NABA), as well as 23 healthy controls were under study. Expression of the SOCS5 mRNA from mononuclear blood cells was analyzed by RT-PCR. In patients with bronchial asthma, (ABA and NABA) we

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, (921) 359-62-95.
E-mail: vnminee@mail.ru

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

В.В. Лим, В.А. Иванов, Л.Н. Сорокина, В.Н. Минеев, М.А. Нёма, В.И. Трофимов «Экспрессия негативных регуляторов транскрипции генов в мононуклеарных клетках периферической крови больных бронхиальной астмой» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 451-458. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-451-458

© Лим В.В. и соавт., 2016

For citation:

V.V. Lim, V.A. Ivanov, L.N. Sorokina, V.N. Mineev, M.A. Nyoma, V.I. Trofimov "Expression of negative transcription regulators in peripheral blood mononuclears in patients with bronchial asthma", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 451-458. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-451-458

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-451-458>

determined a significant increase of mRNA expression levels for a SOCS5 negative transcription regulator in peripheral blood mononuclears, in comparison with control group. Thus, an increase of SOCS5-expression, and of the SOCS3 mRNA expression in patients with BA may be associated with protective anti-inflammatory response.

Keywords: bronchial asthma, SOCS-proteins, SOCS3, SOCS5, mononuclear blood cells

Введение

Изучение механизмов развития бронхиальной астмы дает основание полагать, что в патогенезе заболевания важную роль играют нарушения регуляторных процессов, в частности в системе негативной регуляции клеточной сигнализации [3, 5, 10].

Проведенные нами исследования семейства SOCS-белков (супрессоры цитокиновой сигнализации – Suppressors of cytokine signaling) подтвердили мнение ряда авторов о важности трех его представителей, а именно SOCS1, SOCS3 и SOCS5 в патогенезе заболевания [3, 5, 6].

В настоящее время считается, что негативный регулятор цитокиновой сигнализации SOCS5, наряду с уже рассмотренными нами ранее SOCS1 и SOCS3, участвует в Th-клеточной дифференцировке и может влиять на баланс Th1-/Th2-клеток [8]. SOCS3 в основном экспрессируется в Th2-клетках и ингибирует Th1-дифференцировку. И наоборот, SOCS5 в основном экспрессируется в Th1-клетках и ингибирует дифференциацию в Th2 [10].

Предполагается роль SOCS5 (и SOCS1) в регуляции цитокиновой сигнализации IL-4 и IL-13 [9]. Так, по результатам эксперимента [7], предполагалось, что SOCS5 может связываться с цитоплазматической частью IL-4R α , тем самым нарушая STAT6 сигнализацию, индуцированную IL-4 и IL-13.

Целью данного исследования является изучение экспрессии мРНК регулятора транскрипции SOCS5 в мононуклеарных клетках периферической крови больных аллергической и неаллергической БА.

Материалы и методы

Нами обследовано 23 практически здоровых лица, 60 с аллергической БА (АБА) и 41 с неаллергической БА (НАБА). 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 классифика-

цией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (Global Initiative of Asthma – GINA, 2013).

Выделение мононуклеарных клеток периферической крови и исследование экспрессии мРНК SOCS5 методом RT-PCR было подробно описано нами ранее [1, 4, 6]. Работа выполнена на базе лаборатории Научно-методического центра по молекулярной медицине на базе ПСПбГМУ им. И.П. Павлова.

Праймеры для SOCS5 были разработаны на основе известных последовательностей (GenBank).

SOCS5 5': 5'- TGTGAGCCCCACATTCAACAT-3' и SOCS5 3': 5'- ATGGGTATGGCTGTCTCCAG -3'.

β -актин -5': 5'-TCCTGTGGCATCCACGAAACT-3' и β -актин-3': 5'-GAAGCATTTGCGGTGGACGAT-3'.

Уровень экспрессии мРНК SOCS5 оценивали относительно уровня β -актина.

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью стандартного пакета прикладного статистического анализа SPSS для Windows (русифицированная версия 13.0). Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Рассмотрим результаты исследования экспрессии SOCS5 на транскрипционном, точнее, на посттранскрипционном уровне синтеза матричной РНК SOCS5 (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Обследованные группы	Значение*	Достоверность различий
Контрольная группа: n = 23 (1)	0,78 $\pm$ 0,36	$p_{ANOVA} = 0,020$ $p_{1-2} = 0,045^{**}$ $p_{1-3} = 0,006^{**}$ $p_{2-3} > 0,05^{**}$
Больные АБА: n = 60 (2)	0,97 $\pm$ 0,38	
Больные НАБА: n = 41 (3)	1,07 $\pm$ 0,38	

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA;

* – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий. Для сравнения средних использован однофакторный дисперсионный анализ, применен критерий Тьюки (так как дисперсии не различаются).

Как видно из таблицы 1, у больных АБА и НАБА отмечается выраженное повышение уровня экспрессии мРНК SOCS5 в мононуклеарах периферической крови по сравнению с контрольной группой (в 1,24 раза и 1,37 раза соответственно).

Данные изменения при бронхиальной астме представляются достаточно закономерными, поскольку при этом заболевании, как известно, повышается IL-4 и IL-13 сигнализация.

Рассмотрим результаты исследования экспрессии SOCS5 в условиях действия IL-4 (табл. 2).

Исследование экспрессии мРНК SOCS5 в условиях действия IL-4 показало тенденцию к нарастанию этого показателя в группе больных АБА по сравнению с контрольной группой (табл. 2).

Учитывая, что IL-4 стимулирует в В-клетках транскрипцию ϵ -цепей и индуцирует переключение на синтез IgE, нас интересовал вопрос о непосредственной роли SOCS5 в регуляции IL-4 сигнализации.

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 В УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВИЯ IL-4 В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Обследованные группы	Значение	Достоверность различий
Контрольная группа: n = 3 (1)	0,61 $\pm$ 0,11*	$p_{ANOVA} = 0,581$ $p_{1-2} > 0,05^{**}$
Больные БА: n = 8 (2)	0,67 $\pm$ 0,18*	

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA;

* – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$) (параметрическая статистика);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий – для сравнения средних использован однофакторный дисперсионный анализ (с применением апостериорного Т-критерия, так как дисперсии не различаются).

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Фаза заболевания	Значения	Достоверность различий
Обострение (1) n = 19	1,01 $\pm$ 0,40*	$p_{1-2} > 0,05^{**}$
Ремиссия (2) n = 19	0,88 $\pm$ 0,42*	

Примечание. * – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, применяются методы параметрической статистики; указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения средних использован t-критерий для парных выборок).

Для анализа изменений экспрессии мРНК SOCS5 нами было проведено исследование экспрессии данного негативного регулятора в начале и по окончании лечения обострения бронхиальной астмы. Всем обследованным в динамике больным проводилась парентеральная глюкокортикостероидная терапия. Результаты исследования экспрессии SOCS5 в зависимости от фазы заболевания представлены в таблице 3.

Как видно из таблицы 3, отмечалось некоторое нарастание уровня экспрессии мРНК SOCS5 в фазе обострения бронхиальной астмы, но статистическая обработка данных свидетельствует об отсутствии значимых изменений уровня экспрессии мРНК SOCS5, в зависимости от фазы заболевания.

Данный факт, по-видимому, позволяет предполагать, что в условиях обострения бронхиальной астмы наблюдаемое повышение мРНК SOCS5 может быть обусловлено повышением активности IL-4 сигнализации.

При анализе отдельно по группам АБА и НАБА уровней экспрессии мРНК SOCS5 значимых различий между фазой обострения и ремиссии не обнаружено. Отсутствие значимых изменений при АБА косвенно может свидетельствовать о сохранении нарушений регуляции экспрессии мРНК SOCS5 и в фазе ремиссии (табл. 4, 5).

ТАБЛИЦА 4. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ НАБА (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Фаза заболевания	Значение*	Достоверность различий
Обострение (1), n = 10	1,05 $\pm$ 0,41	$p_{1-2} > 0,05^{**}$
Ремиссия (2), n = 10	1,04 $\pm$ 0,29	

Примечание. * – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, применяются методы параметрической статистики; указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения средних использован t-критерий для парных выборок).

ТАБЛИЦА 5. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАЗЫ ЗАБОЛЕВАНИЯ ПРИ АБА (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Фаза заболевания	Значение*	Достоверность различий
Обострение (1), n = 9	0,98 $\pm$ 0,39	$p_{1-2} > 0,05^{**}$
Ремиссия (2), n = 9	0,85 $\pm$ 0,43	

Примечание. * – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, применяются методы параметрической статистики; указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения средних использован t-критерий для парных выборок).

Нами был проведен анализ экспрессии мРНК SOCS5 в зависимости от тяжести течения бронхиальной астмы (табл. 6, 7).

Как видно из таблицы 6, при АБА уровень экспрессии мРНК SOCS5 отличается в зависимо-

ТАБЛИЦА 6. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ПРИ АБА (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Обследованные группы	Значение*	Достоверность различий
Легкое течение АБА(1) n = 25	0,69±0,26	p = 0,769* p ₁₋₂ = 0,004** p ₁₋₃ = 0,042** p ₂₋₃ = 0,951** p _{1-2-3 ANOVA} = 0,002***
Средней тяжести АБА(2) n = 28	0,98±0,37	
Тяжелое течение АБА(3) n = 7	1,02±0,21	

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA;

* – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению (по критерию Колмогорова–Смирнова $p > 0,05$), используется параметрическая статистика: указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий. Для сравнения средних использован однофакторный дисперсионный анализ, применен критерий Тьюки (так как дисперсии не различаются).

*** – уровень значимости различий между группами ANOVA.

ТАБЛИЦА 7. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТЯЖЕСТИ ТЕЧЕНИЯ ПРИ НАБА (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Обследованные группы	Значение*	Достоверность различий
Легкое течение НАБА(1) n = 5	1,12±0,10	p = 0,78* p ₁₋₂ = 0,953** p ₁₋₃ = 0,882** p ₂₋₃ = 0,951** p _{1-2-3 ANOVA} = 0,887***
Средней тяжести НАБА(2) n = 23	1,07±0,43	
Тяжелое течение НАБА(3) n = 13	1,03±0,38	

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA;

* – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению (по критерию Колмогорова–Смирнова $p > 0,05$), используется параметрическая статистика: указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий. Для сравнения средних использован однофакторный дисперсионный анализ, применен критерий Тьюки (так как дисперсии не различаются).

*** – уровень значимости различий между группами ANOVA.

сти от тяжести течения заболевания. При легкой степени АБА он ниже, чем при средней и тяжелой АБА. Различий в уровнях экспрессии мРНК SOCS5 при средней и тяжелой АБА не отмечается.

При НАБА уровни экспрессии мРНК SOCS5 значимо не меняются в зависимости от степени тяжести заболевания (табл. 7).

Нами проведен анализ уровней экспрессии мРНК SOCS5 в зависимости от наличия системной глюкокортикостероидной терапии (табл. 8).

Оценивая полученные данные, прежде всего, надо отметить, что больные БА, получающие системную глюкокортикостероидную терапию, имеют значительно более высокие показатели экспрессии мРНК SOCS5 в сравнении с контрольной группой.

Что касается больных, не получающих терапию системными ГКС (в том числе больных

ТАБЛИЦА 8. УРОВНИ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 (RT-PCR) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ТИПА ПРИМЕНЯЕМОЙ ГЛЮКОКОРТИКОСТЕРОИДНОЙ ТЕРАПИИ (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Обследованные группы	Значение*	Достоверность различий
Практически здоровые лица, n = 23 (1)	0,78±0,36	p ₁₋₂ = 0,981** p ₁₋₃ = 0,999** p ₁₋₄ = 0,010** p ₁₋₅ = 0,53** p ₂₋₃ = 0,948** p ₂₋₄ = 0,162** p ₂₋₅ = 0,801** p ₃₋₄ = 0,003** p ₃₋₅ = 0,444** p ₄₋₅ = 0,999** p _{1-2-3-4-5 ANOVA} = 0,001***
Больные БА, не получающие терапию системными ГКС, n = 16 (2)	0,84±0,31	
Больные БА, получающие терапию ингаляционными ГКС, n = 26 (3)	0,76±0,26	
Больные БА, получающие терапию системными пероральными ГКС, n = 53 (4)	1,07±0,39	
Больные БА, получающие терапию системными пероральными ГКС, n = 6 (5)	1,03±0,33	

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA;

* – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению (по критерию Колмогорова–Смирнова $p > 0,05$), используется параметрическая статистика: указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$);

** – уровень значимости, определяющий достоверность различий. Для сравнения средних использован однофакторный дисперсионный анализ, применен критерий Тьюки (так как дисперсии не различаются) ($p = 0,726$).

с ингаляционной терапией ГКС), то их значения экспрессии мРНК SOCS5 сопоставимы с контрольной группой. Вероятно, это связано с мало-выраженными изменениями экспрессии регуляторов клеточной сигнализации при отсутствии терапии ГКС.

С целью оценки роли исследуемого регулятора клеточной сигнализации SOCS5 был проведен

корреляционный анализ, результаты которого представлены в таблицах 9, 10.

Анализируя результаты проведенного нами корреляционного анализа (табл. 9, 10), необходимо обсудить следующие факты. Во-первых, отмечается наличие особенностей корреляционных связей при АБА и НАБА, что заставляет предполагать существование различий в патогенезе этих вариантов заболевания. Еще одним важным

ТАБЛИЦА 9. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У БОЛЬНЫХ АБА

Показатель	n	Коэффициент корреляции*	Знак связи	Достоверность связи
Уровень экспрессии SOCS3 после IL-4 (иммуноблоттинг)	35	0,276	+	p = 0,020*
Концентрация IL-5 (пг/мл)	10	0,581	-	p = 0,032**
Тяжесть заболевания	60	0,247	+	p = 0,044***
Фаза АБА	60	0,226	-	p = 0,026**
Наличие пищевой сенсибилизации	60	0,219	+	p = 0,030**
Наличие бытовой сенсибилизации	60	0,209	-	p = 0,044*
МОС50 выдоха в % от должного до бронхолитика (л/с)	52	0,219	-	p = 0,022**
МОС50 выдоха в % от должного после бронхолитика (л/с)	51	0,202	-	p = 0,036**
Содержание базофилов в мокроте (%)	60	0,321	-	p = 0,011*

Примечание. * – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, использован коэффициент корреляции Пирсона;

– при распределениях, отличающихся от нормального, использованы коэффициенты корреляции Кендалла (**) и Спирмена (***).

ТАБЛИЦА 10. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ КОРРЕЛЯЦИОННЫХ СВЯЗЕЙ МЕЖДУ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS5 И КЛИНИКО-ЛАБОРАТОРНЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ У БОЛЬНЫХ НАБА

Показатели	n	Коэффициент корреляции*	Знак связи	Достоверность связи
Длительность курения (годы)	11	0,610	+	p = 0,046*
Наличие антибактериальной терапии	41	0,419	-	p = 0,001**
Наличие вазомоторного ринита	41	0,337	+	p = 0,029***
МОС75 выдоха в % от должного до бронхолитика (л/с)	39	0,244	+	p = 0,029**
МОС50 выдоха в % от должного после бронхолитика (л/с)	41	0,310	+	p = 0,003**
Содержание эозинофилов в мокроте (%)	31	0,523	+	p = 0,003*

Примечание. * – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, использован коэффициент корреляции Пирсона;

– при распределениях, отличающихся от нормального, использованы коэффициенты корреляции Кендалла (**) и Спирмена (***).

моментом является возможная роль SOCS5 в механизмах утяжеления заболевания (как при АБА, так и при НАБА). Так, наличие при АБА положительных корреляционных связей между уровнем экспрессии SOCS5 как негативного регулятора транскрипции генов и наличием бытовой, пищевой сенсибилизации, тяжестью, фазой АБА представляется закономерным. Важным является и существование значимых отрицательных корреляционных связей с концентрацией IL-5 в плазме крови, с уровнем базофилов в мокроте и положительных связей с экспрессией белка-регулятора SOCS3, с экспрессией мРНК STAT4, что отражает регуляторную роль мРНК SOCS5 (RT-PCR) в клеточных cross-talk взаимодействиях. Выявленные нами отрицательные корреляционные связи мРНК SOCS5 (RT-PCR) с показателями скорости и сопротивления дыхательных путей при исследовании функции внешнего дыхания также могут косвенно отражать его роль в механизмах утяжеления заболевания.

Представляется немаловажной положительная корреляционная связь экспрессии мРНК SOCS5 с уровнем эозинофилов в мокроте, что указывает на важную регуляторную роль SOCS5 в цитокиновой сигнализации при НАБА. Показательно, что при АБА подобная связь отсутствует.

Достаточно важным для НАБА является и существование отрицательной связи между экспрессией SOCS5 и наличием антибактериальной терапии: по-видимому, она характеризует повышение экспрессии данного негативного регулятора в отсутствие антибактериальной терапии. Не случайна и связь между уровнем SOCS5 и стажем курения, наличием вазомоторного (а не аллергического) ринита у больных НАБА.

Обсуждение

В результате исследования особенностей экспрессии негативного регулятора транскрипции генов SOCS5 на примере лимфоцитов периферической крови в контрольной группе и у больных бронхиальной астмой нами были сделаны следующие выводы:

1. У больных АБА и НАБА отмечается выраженное повышение уровня экспрессии мРНК SOCS5 по сравнению с контрольной группой (в 1,24 раза и 1,37 раза соответственно), что, по-видимому, является результатом повышения IL-4 и IL-13 сигнализации при бронхиальной астме.

2. При АБА уровень экспрессии мРНК SOCS5 отличается в зависимости от тяжести течения заболевания. При легкой степени АБА он ниже, чем при средней и тяжелой АБА. Различий в уровнях экспрессии мРНК SOCS5 при средней и тяжелой АБА не отмечается.

3. При НАБА уровни экспрессии мРНК SOCS5 значимо не меняются в зависимости от степени тяжести заболевания. При исследовании по группам АБА и НАБА уровней экспрессии мРНК SOCS5 различий между фазой обострения и ремиссии не обнаружено.

4. Больные БА, получающие системную глюкокортикостероидную терапию, имеют значительно более высокие показатели экспрессии мРНК SOCS5 в сравнении с контрольной группой. Что касается больных, не получающих терапию системными ГКС (в том числе больных с ингаляционной терапией ГКС), то их значения экспрессии мРНК SOCS5 сопоставимы с контрольной группой.

5. Выявленные нами корреляционные связи позволяют заключить: характер корреляционных связей при АБА и НАБА различен, что указывает на возможное существование различий в патогенезе этих вариантов заболевания; очевидна роль SOCS5 в механизмах утяжеления заболевания (более выраженная у больных АБА).

Ранее нами подробно рассматривались экспрессии других белков из семейства SOCS, а именно SOCS1 и SOCS3, как отмечалось, наиболее важных в патогенезе бронхиальной астмы [1, 2]. Сейчас с использованием новых данных с целью интегральной характеристики негативных регуляторов транскрипции генов нами был разработан интегральный коэффициент, учитывающий баланс соотношений их уровней экспрессии у каждого обследованного и рассчитываемый как произведение экспрессий мРНК всех трех супрессоров цитокиновой сигнализации:

$$E_i = \text{мРНК SOCS1} \times \text{мРНК SOCS3} \times \text{мРНК SOCS5}$$

Результаты исследования представлены в таблице 11.

Кроме того, для более точной и тонкой оценки суммарного вклада всех исследованных нами регуляторов нами был проведен анализ суммарной экспрессии мРНК SOCS-супрессоров цитокиновой сигнализации по формуле (что позволило учесть и минимальные значения экспрессии у отдельных больных):

$$E_{\Sigma} = \text{мРНК SOCS1} + \text{мРНК SOCS3} + \text{мРНК SOCS5}$$

Анализируя данные таблиц 11 и 12, можно сделать вывод об изменении SOCS-регуляции при бронхиальной астме. При этом в группе больных аллергической бронхиальной астмой отмечается существенное снижение рассчитанных нами коэффициентов, что, по-видимому, может рассматриваться как комплексное изменение кооперативной регуляции с помощью супрессоров цитокиновой сигнализации, в основе которого

ТАБЛИЦА 11. ИНТЕГРАЛЬНЫЙ КОЭФФИЦИЕНТ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS-РЕГУЛЯТОРОВ E_i В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Обследованные группы	Значение	Достоверность различий
Контрольная группа n = 21 (1)	0,091 (0,04; 0,17)*	$p_{1-2} = 0,007^{**}$ $p_{1-2} = 0,019^{***}$ $p_{2-3} = 0,002^{***}$ $p_{1-3} = 0,614^{***}$
Больные АБА n = 37 (2)	0,046 (0,012; 0,11)*	
Больные НАБА n = 39 (3)	0,149 (0,037; 0,22)*	

Примечание. * – распределение отличается от нормального (по критерию Колмогорова–Смирнова $p < 0,05$), поэтому используется непараметрическая статистика: Медиана (25-75 процентиля);
** – распределение отличается от нормального, поэтому использован критерий Н независимых выборок Краскела–Уоллеса ($p = 0,004$) и критерий Джонхiera–Терпстры для попарного сравнения между собой более двух групп ($p = 0,007$);
*** – уровень значимости для сравнения двух независимых выборок (использован U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни).

лежат дефекты негативного регуляторного контроля. НАБА, напротив, характеризуется некоторым повышением значений данных коэффициентов, что косвенно позволяет предполагать индукцию SOCS-регуляции в ответ на повышенную цитокиновую сигнализацию у этой группы больных.

Выявленные нами особенности экспрессии супрессоров цитокиновой сигнализации, вероятно, могут указывать на существование наруше-

ТАБЛИЦА 12. КОЭФФИЦИЕНТ ОБЩЕЙ ЭКСПРЕССИИ мРНК SOCS-РЕГУЛЯТОРОВ E_{Σ} В ОБСЛЕДОВАННЫХ ГРУППАХ (стандартизованы по отношению к экспрессии β -актина)

Обследованные группы	Значение	Достоверность различий
Контрольная группа n = 21 (1)	1,68±0,55*	$p_{ANOVA} = 0,001$ $p_{1-2} = 0,033^{***}$ $p_{2-3} = 0,0001^{***}$ $p_{2-3} = 0,001^{**}$ $p_{1-3} > 0,05^{**}$
Больные АБА n = 37 (2)	1,39±0,46*	
Больные НАБА n = 39 (3)	1,86±0,56*	

Примечание. Использован однофакторный дисперсионный анализ ANOVA;
* – для выборок, подчиняющихся нормальному распределению, указаны среднее значение и значение стандартного отклонения ($M \pm \sigma$);
** – уровень значимости, определяющий достоверность различий (для сравнения средних использован однофакторный дисперсионный анализ с применением апостериорного критерия Тьюки [дисперсии не различаются]);
***- использован t-критерий для несвязанных выборок.

ний негативной регуляции клеточной сигнализации у больных бронхиальной астмой.

Полученные данные позволяют рассматривать сложность нарушений регуляции, возникающих на различных уровнях клеточной сигнализации, с позиций полифункциональности молекул семейства негативных регуляторов транскрипции генов SOCS1, SOCS3 и SOCS5, обеспечивающих комплексный контроль цитокиновой сигнализации одновременно в различных сигнальных путях.

Список литературы / References

1. Лим В.В., Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Нёма М.А., Трофимов В.И. Экспрессия негативных регуляторов транскрипции генов SOCS3 и SOCS5 в мононуклеарных клетках периферической крови больных бронхиальной астмой // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 2. С. 149-154. [Lim V.V., Sorokina L.N., Mineev V.N., Nyoma M.A., Trofimov V.I. The expression of mRNA SOCS3 and SOCS5 in peripheral blood mononuclears of patient with bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 2, pp. 149-154. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-2-149-154>.
2. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Современные представления о JAK-STAT системе как новой сигнальной системе и ее нарушениях при иммунной патологии // Аллергология, 2005. № 4. С.38-44. [Mineev V.N., Sorokina L.N. Modern opinions about new signal system JAK STAT and its disturbance in immunity pathology. *Allergologiya = Allergology*, 2005, no. 4, pp. 38-44. (In Russ.)]
3. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н. Экспрессия STAT6 в лимфоцитах периферической крови больных аллергической бронхиальной астмой // Медицинская иммунология, 2007. Т. 9, № 4-5. С. 405-410. [Mineev V.N., Sorokina L.N. The expression STAT6 in peripheral blood lymphocytes in patients with allergic bronchial asthma. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2007, Vol. 9, no. 4-5, pp. 405-410. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2007-4-5-405-410>.
4. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Лим В.В., Нёма М.А., Иванов В.А., Липкин Г.И. Роль SOCS-белков в негативной регуляции JAK-STAT сигнализации // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 2. С. 10-15. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Lim V.V., Nyoma M.A., Ivanov V.A., Lipkin G.I. The role of SOCS proteins in negative regulation of JAK-STAT signaling. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 2, pp. 10-15. (In Russ.)]
5. Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Трофимов В.И. Фундаментальные и клинические аспекты JAK-STAT-сигнализации. СПб.: BBM, 2010. 120 с. [Mineev V.N., Sorokina L.N., Trofimov V.I. Fundamental and clinical aspects of the JAK-STAT-signaling]. St. Petersburg: BBM, 2010. 120 p.

6. Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Лим В.В., Нёма М.А., Трофимов В.И. Экспрессия негативного регулятора транскрипции генов белка SOCS1 в мононуклеарах периферической крови больных бронхиальной астмой // Цитокины и воспаление, 2012. Т. 11, № 2. С. 49-54. [Sorokina L.N., Mineev V.N., Lim V.V., Nyoma M.A., Trofimov V.I. SOCS1 expression in peripheral blood mononuclears of patients with bronchial asthma. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 2, pp. 49-54. (In Russ.)]
7. Fichtner-Feigl S., Fuss I.J., Young C.A., Tomohiro Watanabe, Edward K. Geissler, Hans-Jürgen Schlitt, Atsushi Kitani, Warren Strober. Induction of IL-13 triggers TGF-beta1-dependent tissue fibrosis in chronic 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 9, pp. 5859-5870.
8. Inoue H., Kubo M. SOCS proteins in T helper cell differentiation: implications for allergic disorders? *Expert. Rev. Mol. Med.*, 2004, Vol. 6, no. 22, pp. 1-11.
9. Seki Y., Hayashi K., Matsumoto A., Seki N., Tsukada J., Ransom J., Naka T., Kishimoto T., Yoshimura A., Kubo M. Expression of the suppressor of cytokine signaling-5 (SOCS5) negatively regulates IL-4-dependent STAT-6 activation and Th2 differentiation. *PNAS*, 2002, Vol. 99, no. 20, pp. 13003-13008.
10. Yoshimura A., Suzuki M., Sakaguchi R., Hanada T., Yasukawa H. SOCS, inflammation, and autoimmunity. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 20.

Авторы:

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

Иванов В.А. — очный аспирант, 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

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:

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

Ivanov V.A., Postdoc Fellow, M. Chernorutsky Hospital Therapy Department with a Course of Allergology and Immunology, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

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

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

Поступила 13.11.2015
Принята к печати 07.12.2015

Received 13.11.2015
Accepted 07.12.2015

ЦИТОКИНПРОДУЦИРУЮЩИЙ РЕЗЕРВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫХ КЛЕТОК КРОВИ И ИНВАЗИВНОГО ПРОТОКОВОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ, ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННОГО НОВООБРАЗОВАНИЯ

**Архипов С.А.¹, Михайлова Е.С.², Кунц Т.А.¹, Карпухина К.В.²,
Могильная Е.Д.¹, Соловьев К.А.¹, Вараксин Н.А.³, Аутеншлюс А.И.^{1,2}**

¹ ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет» г. Новосибирск, Россия

² Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

³ Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение взаимосвязи между цитокинпродуцирующим резервом инвазивного протокового рака молочной железы и его микроокружения, с цитокинпродуцирующим резервом иммунокомпетентных клеток крови, а также с патогистологическими и иммуногистохимическими характеристиками рака молочной железы. С помощью ИФА исследовали спонтанный и стимулированный поликлональными активаторами цитокинпродуцирующий резерв ИКК периферической крови и биоптатов инвазивного протокового рака молочной железы (аденокарцинома) 34 женщин, значения которого выражали с помощью индекса влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1). Иммуногистохимическим методом исследовали в биоптатах опухоли экспрессию VEGF-A, рецепторов ER, PR и маркера пролиферации Ki-67. ИВПА ИКК крови на продукцию исследованных цитокинов в большинстве случаев, за исключением IL-18, IL-1 β и MCP-1, был более высоким по сравнению с ИВПА на продукцию цитокинов опухолью и ее микроокружением. Только ИВПА на продукцию провоспалительного и «проонкогенного» цитокина IL-18 клетками опухоли и ее микроокружением был повышен по сравнению с ИВПА на продукцию этого цитокина ИКК крови. Изучение сопряженности ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли, с ИВПА на экспрессию VEGF-A в опухоли, с патогистологическими параметрами и экспрессией эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67, позволило выявить, прямую

Адрес для переписки:

Архипов Сергей Алексеевич
ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный
медицинский университет»
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел.: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: arhipowsergei@yandex.ru

Address for correspondence:

Arhipov Sergey A.
Novosibirsk State Medical University
630091, Russian Federation, Novosibirsk, Krasny ave, 52.
Phone: 7 (383) 226-35-60.
E-mail: arhipowsergei@yandex.ru

Образец цитирования:

С.А. Архипов, Е.С. Михайлова, Т.А. Кунц, К.В. Карпухина, Е.Д. Могильная, К.А. Соловьев, Н.А. Вараксин, А.И. Аутеншлюс «Цитокинпродуцирующий резерв иммунокомпетентных клеток крови и инвазивного протокового рака молочной железы, его взаимосвязь с патогистологическими и иммуногистохимическими параметрами злокачественного новообразования» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 459-468. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-459-468

© Архипов С.А. и соавт., 2016

For citation:

S.A. Arhipov, E.S. Mikhailova, T.A. Kunts, K.V. Karpukhina, E.D. Mogilnaya, K.A. Solovyev, N.A. Varaksin, A.I. Autenshlyus "Cytokine-producing reserve of immunocompetent cells from blood and invasive ductal breast cancer tissues: its correlation with histopathological and immunohistochemical parameters of malignant neoplasia", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 459-468. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-459-468

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-459-468>

корреляционную связь между исследуемыми показателями. Высокая положительная корреляционная связь была получена между ИВПА на продукцию опухоли и ее микроокружением TNF α и степенью васкуляризации опухоли. Выявлена отрицательная корреляционная связь между ИВПА IL-6, между MCP-1 и маркером пролиферативной активности клеток Ki-67. Выявлена прямая корреляционная связь между соотношением ИВПА на продукцию ИКК крови IL-1ra и IL-1 β (IL-1ra / IL-1 β) и ИВПА на экспрессию VEGF-A аденокарциномой и ее микроокружением, что свидетельствует о взаимосвязи продукции IL-1ra ИКК с экспрессией VEGF-A. Было выявлено несколько пересекающихся, разветвляющихся и даже замыкающихся в «круг» цепей корреляционных связей: VEGF-A (иммуногистохимический показатель экспрессии по ИВПА) – IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – IL-8 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – MCP-1 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – IL-6 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте) – VEGF-A (иммуногистохимический показатель экспрессии по ИВПА). В результате проведенного исследования определены взаимосвязи цитокинпродуцирующих резервов опухоли, выявленных при воздействии ПА на ИПР с процессами, протекающими в самой опухоли, оцениваемых по патогистологическим и иммуногистохимическим параметрам. Полученные данные свидетельствуют о сложных механизмах, опосредованных цитокинами, обеспечивающими инвазивный рост злокачественной опухоли.

Ключевые слова: поликлональные активаторы, цитокины, иммунокомпетентные клетки крови, рак молочной железы

CYTOKINE-PRODUCING RESERVE OF IMMUNOCOMPETENT CELLS FROM BLOOD AND INVASIVE DUCTAL BREAST CANCER TISSUES: ITS CORRELATION WITH HISTOPATHOLOGICAL AND IMMUNOHISTOCHEMICAL PARAMETERS OF MALIGNANT NEOPLASIA

Arkhipov S.A.^a, Mikhailova E.S.^b, Kunts T.A.^a, Karpukhina K.V.^b,
Mogilnaya E.D.^a, Solovyev K.A.^a, Varaksin N.A.^c, Autenshlyus A.I.^{a, b}

^a Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

^b Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

^c Closed Joint Stock Company "Vector-Best", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. The aim of the study was to investigate a relationship between cytokine-producing reserve of invasive ductal cancer cells and its microenvironment, and cytokine-producing reserve of immunocompetent blood cells (IBC), as well as with histopathological and immunohistochemical characteristics of breast cancer. Using ELISA method we investigated the spontaneous and stimulated with polyclonal activators (PA) cytokine-producing reserve of IBC and biopsy specimens from invasive ductal cancer (adenocarcinoma) in 34 women. Appropriate values were expressed by the Influence Index of polyclonal activators (IIPA) upon cytokine production (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1ra, TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1). In tumor biopsies, we studied expression of VEGF-A, estrogen receptor, progesterone receptor and pro-proliferation marker Ki-67 by means of immunohistochemical method. Activation values of blood IBC in most cases, except of IL-18, IL-1 β and MCP-1, were higher than appropriate effects upon cytokine production by tumor tissues. Meanwhile, the IIPA activation index upon IL-18 (a proinflammatory and prooncogene cytokine) production by tumor cells and its microenvironment proved to be elevated, as compared to appropriate IIPA by the blood IBC. Statistical studies showed a direct correlation between IIPA and cytokine production in tumor supernates, IIPA of VEGF-A expression in tumor tissue, with pathohistological parameters and expression of estrogen and progesterone receptors and Ki-67 proliferation marker. A high positive correlation was obtained between IIPA TNF α production by the tumor tissue, and degree of tumor vascularization.

We have revealed a negative correlation between IIPA for IL-6, MCP-1 and Ki-67 marker of cell proliferation. A direct correlation was found between IIPA values for IL-1ra/IL-1 β production ratios in blood cells, and IIPA for VEGF-A expression in adenocarcinoma tissues, thus indicating to probable connections

between IL-1ra production by IBC and VEGF-A expression. We have discerned several intersecting, diverging, and even circle-closed correlative chains of correlation, e.g.: VEGF-A (immunohistochemical marker of IIPA expression) – IL-10 and IL-8 (IIPA for supernate products); MCP-1, IL-6, and IL-10 (IIPA for supernate products) – VEGF-A (immunohistochemical indicator of expression for IIPA). The results of this study suggest a relationship between cytokine-producing reserves of the tumor identified by appropriate PA correlations with the processes occurring in malignant tumors, as assessed by histopathological and immunohistochemical parameters. The data are indicative for some complex mechanisms mediated by cytokines which provide invasive growth of malignant tumor.

Keywords: polyclonal activators, cytokines, blood immunocompetent cells, breast cancer

Введение

Цитокины относят к одним из центральных регуляторов иммунного гомеостаза, которые играют важную роль в противоопухолевой защите организма человека [4, 12, 14]. Вместе с тем известно, что иммунная система человека обладает способностью продуцировать факторы, осуществляющие не только иммунный надзор, препятствующий появлению в организме атипических клеток, но и стимулирующие рост и прогрессию опухоли [5, 12, 20, 22].

Согласно одной из современных концепций опухолевого роста, роль цитокинов в канцерогенезе складывается из ряда сложных взаимодействий между ними, приводящих к дисрегуляции сформированной цитокиновой сети [4, 11]. Нарушение функционирования этой сети является одним из условий развития злокачественных новообразований [30], при которых цитокины становятся патогенетическими факторами опухолевой прогрессии [5, 6, 10]. Показано, например, что IL-6, IL-8, IL-10, IL-18, IL-1 α и его рецепторный антагонист IL-1ra способны продуцироваться опухолевыми клетками и проявляют себя как факторы, активирующие ангиогенез, усиливающие инвазию и миграцию опухолевых клеток, а TNF α , являясь индуктором апоптоза и неоангиогенеза, может вызывать усиление гибели лимфоцитов, инфильтрирующих опухоль и способствовать пролиферации и распространению опухолевых клеток в организме [1, 12]. Показано, что цитокин IL-18, относящийся к семейству интерлейкина 1 (IL-1), может обладать как провоспалительным, так и «проонкогенным» действием [12, 22].

В процессе роста опухоли ее клетки находятся в постоянном взаимодействии между собой, с клетками стромы опухоли (фибробластами, тучными клетками, дендритными клетками и др.), с иммунокомпетентными клетками, инфильтрирующими опухоль, а также с транзиторными клетками, преимущественно иммунной системы, которые постоянно рециркулируют по сосудистой сети опухоли и всего организма-

опухоленосителя. При этом неоангиогенез, на основе уже существующей в ткани сети сосудов, является необходимым условием для роста опухоли, а высокая степень васкуляризации обеспечивает инвазивный рост опухоли [1, 3, 15, 18].

Существует точка зрения, что при злокачественном новообразовании цитокины взаимодействуют в рамках двух систем: «опухоль – цитокины» и «иммунная система – цитокины» [3, 12, 20]. Согласно данным, представленным в ряде работ, изменения цитокинпродуцирующей активности иммунокомпетентных клеток, выявленные при злокачественных новообразованиях, возможно, являются одним из главных факторов нарушения противоопухолевой защиты организма [5, 7, 9, 23], что обуславливает необходимость проведения исследований в этом направлении, которые бы учитывали как минимум цитокинпродуцирующий резерв опухолевых клеток и их микроокружения (клеток рыхлой соединительной ткани опухоли; иммунокомпетентных клеток, инфильтрирующих ткань опухоли; мезенхимальных стволовых клеток, мигрирующих в опухоль и др.), а также цитокинпродуцирующий резерв иммунокомпетентных клеток крови (ИКК).

Целью настоящего исследования явилось изучение взаимосвязи между цитокинпродуцирующим резервом инвазивного протокового рака молочной железы и его микроокружения, с цитокинпродуцирующим резервом иммунокомпетентных клеток крови, а также с патогистологическими и иммуногистохимическими характеристиками рака молочной железы.

Материалы и методы

Материалом исследования служила периферическая кровь и биоптаты инвазивного протокового рака молочной железы, являющимся по гистологическому типу аденокарциномой, 34 женщин в возрасте от 45 до 60 лет. Для оценки цитокинпродуцирующего резерва ИКК крови, опухоли и ее микроокружения применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА),

состоящий из фитогемагглютинаина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «Цитокин-стимул-бест» производства ЗАО «Вектор-Бест». Одну часть клеток крови пациента инкубировали в питательной среде DMEM-F12 (для определения спонтанной продукции), а другую — в таком же объеме среды с комплексом ПА для определения индуцированной продукции цитокинов при 37 °С в течение 24 ч, после чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин в течение 15 мин, получали супернатант, в котором проводили определение концентрации цитокинов. Биоптаты опухолей, полученные методом трепанобиопсии [2] объемом 8 мм³, получали специальным устройством и помещали в 2 флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (спонтанная продукция), а в другом — раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА). После инкубирования при 37 °С в течение 72 ч опухоль извлекали из среды и фиксировали в растворе формалина для дальнейших иммуногистохимических и патогистологических исследований. Для получения очищенного от клеток супернатанта оставшиеся клетки опухоли осаждали центрифугированием при 2000 об/мин 15 мин. В супернатантах после осаждения клеток крови и опухоли с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию следующих цитокинов: IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1 β , IL-1 α , TNF α , IFN γ , G-CSF, GM-CSF, VEGF-A, MCP-1 (монокитарный хемотаксический протеин-1) с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест». Индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на продукцию цитокинов опухолью и ИКК крови, а также клетками ее микроокружения высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А — уровень стимулированной поликлональными активаторами продукции цитокина, Б — уровень спонтанной продукции цитокина.

Для определения потенциальной способности опухоли к экспрессии VEGF-A иммуногистохимическим методом, биоптаты, фиксированные в нейтральном формалине, дегидратировали и заливали в парафин. Депарафинизацию и регидратацию препаратов проводили по стандартной методике через батарею реагентов (ксилола и спиртов) в определенной последовательности (по 3 мин в каждой порции жидкости). Срезы помещали в раствор тритона X-100 на 5 минут для демаскировки VEGF-A. Для блокирования

эндогенной пероксидазы срезы выдерживали в 1% водном растворе H₂O₂ в течение 5 мин. Снижение неспецифического окрашивания проводили обработкой срезов нормальной блокирующей неиммунной сывороткой (из набора VECTASTAIN Elite ABC Kit, США) в течение 10 мин. После чего их инкубировали в течение 1 часа с первыми антителами, специфичными в отношении: VEGF-A (поликлональные кроличьи, Кат. ном. — RB-9031-P, Thermo Scientific, США), Ki-67 (моноклональные кроличьи, Кат. ном. — 790-4286, Ventana Medical System Inc. — «Ventana», США); anti-Estrogen Receptor (ER, SP1) (моноклональные кроличьи, Кат. ном. — 790-4325, «Ventana», США); anti-Progesterone Receptor (PR, 1E2; моноклональные кроличьи, Кат. ном. — 790-4296, «Ventana», США) в конечном разведении 2,5 мкг/мл (в растворе для разведения антител — BD, Cat.n. 559148), после чего инкубировали в течение 30 мин со вторыми биотинилированными антителами (VECTASTAIN Elite ABC Kit, США). Далее проводили инкубацию с авидин-пероксидазным комплексом (VECTASTAIN Elite ABC Kit, США) в течение 30 мин и в хромогенном субстрате, содержащем диаминобензидин, в течение 5 мин. Срезы докрашивали гематоксилином, промывали водой и после дегидратации заключали в балльзам.

Индекс влияния поликлональных активаторов (ИВПА) на экспрессию VEGF-A биоптатами опухолей рассчитывали по вышеуказанной формуле ИВПА = А/Б, где А представлял собой показатель экспрессии VEGF-A, определяемый иммуногистохимическим методом, после стимуляции биоптата поликлональными активаторами, а Б — показатель спонтанной экспрессии VEGF-A, определяемый также иммуногистохимическим методом. ИВПА выражали в условных единицах. Иммуногистохимический показатель экспрессии VEGF-A выражали в % окрашенной зоны цифрового изображения исследуемого среза. Фотографирование гистологических препаратов, окрашенных на VEGF-A, выполняли с использованием системы анализа изображений на базе микроскопа Micros MC 300A, цифровой камеры CX 13c («Baumer», Германия). Количественную оценку интенсивности экспрессии VEGF-A выполняли с использованием программного обеспечения ImageJ 1.5 (Национальный институт здоровья, США).

Патогистологическое исследование фиксированных опухолей проводилось патоморфологом на препаратах, окрашенных по стандартной методике гематоксилином и эозином. Патогистологические параметры характеризовали в баллах,

возрастающих от меньшей до большей степени выраженности признака.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Показатели выражали в виде медианы — Ме, нижнего и верхнего процентилей ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$), рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) и его достоверность (p).

Результаты

Из данных, представленных в таблице 1, видно, что ИВПА ИКК крови на продукцию исследованных цитокинов в большинстве случаев, за исключением IL-18, IL-1 β и MCP-1, был более высоким по сравнению с ИВПА на продукцию цитокинов опухолью и ее микроокружением. Только ИВПА на продукцию провоспалительно-

го и «проонкогенного» цитокина IL-18 клетками опухоли и ее микроокружением был повышен по сравнению с ИВПА на продукцию этого цитокина ИКК крови. Представленные в таблице данные соотношения ИВПА на продукцию IL-1 β к ИВПА на продукцию рецепторного антагониста IL-1ra при раке молочной железы были более высокими по сравнению с ИКК крови, что достигалось за счет более низких значений ИВПА на продукцию рецепторного антагониста IL-1ra клетками опухоли и ее микроокружения.

Рассматривая экспрессию VEGF-A в аденокарциноме после инкубации с ПА необходимо отметить, что инкубация с ПА не оказывала влияния на экспрессию VEGF-A, что также подтверждалось незначительным приростом ИВПА (табл. 2).

ТАБЛИЦА 1. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ, АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИЕМ

ИВПА*	Исследуемые образцы	
	периферическая кровь	опухоль
	Ме ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)	Ме ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)
IL-2	13,43 (5,86; 16,19); $p = 3,1 \times 10^{-8}$	1,86 (0,82; 3,59)
IL-6	44,22 (12,77; 121,66); $p = 2,5 \times 10^{-12}$	2,27 (0,99; 2,74)
IL-8	15,66 (4,64; 35,14); $p = 1,2 \times 10^{-8}$	1,40 (0,69; 2,56)
IL-10	29,97 (15,89; 58,06); $p = 1,2 \times 10^{-11}$	1,21 (0,65; 2,06)
IL-17	28,19 (10,62; 60,59); $p = 4,4 \times 10^{-10}$	1,00 (0,71; 3,00)
IL-18	1,16 (1,10; 1,34); $p = 7,4 \times 10^{-5}$	1,92 (1,34; 1,42)
IL-1 β	15,85 (10,54; 32,67)	13,54 (7,99; 40,05)
IL-1ra	10,85 (6,51; 14,38); $p = 2,8 \times 10^{-7}$	2,70 (1,89; 7,53)
TNF α	69,08 (28,50; 151,31); $p = 2,9 \times 10^{-11}$	3,77 (1,07; 9,53)
IFN γ	540,85 (240,26; 713,46); $p = 1,3 \times 10^{-12}$	1,50 (0,94; 3,11)
G-CSF	40,80 (15,79; 147,20); $p = 2,9 \times 10^{-12}$	1,33 (0,98; 2,09)
GM-CSF	13,10 (6,11; 29,09); $p = 1,1 \times 10^{-4}$	3,87 (1,16; 10,30)
VEGF-A	2,23 (1,71; 3,36); $p = 6,7 \times 10^{-11}$	0,50 (0,34; 0,83)
MCP-1	1,05 (0,41; 4,78)	1,09 (0,43; 2,34)
IL-1 β /IL-1ra	1,70 (1,11; 3,29); $p = 1,2 \times 10^{-3}$	6,92 (1,72; 18,46)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СПОНТАННОЙ И ИНДУЦИРОВАННОЙ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫМИ АКТИВАТОРАМИ ЭКСПРЕССИИ VEGF-A В ОБРАЗЦАХ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Показатели экспрессии VEGF-A	Ме ($Q_{0,25}$; $Q_{0,75}$)
Спонтанная экспрессия VEGF-A (иммуногистохимический показатель)	7,70 (3,89; 9,37)
Индукцированная ПА* экспрессия VEGF-A (иммуногистохимический показатель)	7,02 (3,69; 10,29)
ИВПА** на экспрессию VEGF-A	1,25 (0,74; 1,96)

Примечание. * – поликлональные активаторы; ** – индекс влияния поликлональных активаторов.

Изучение сопряженности ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли с ИВПА на экспрессию VEGF-A в самой опухоли, с патогистологическими параметрами и экспрессией эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67 позволило выявить, за редким исключением, прямую корреляционную связь между представленными в таблице 3 показателями. Наиболее высокая положительная корреляционная связь была получена между ИВПА на продукцию аденокарциномой и ее микроокружением TNF α и степенью васкуляризации опухоли, что подтверждало роль TNF α в стимуляции ее ангиогенеза. Кроме этого, только относительное содержание умеренно дифференцированных клеток находилось в прямой корреляционной связи с такими ключевыми факторами роста, как G-CSF и GM-CSF, а также с IL-1 α , который, как известно, контролирует опухолевый рост, модифицирует

строму опухоли и определяет доминирование тех или иных по дифференцировке клеток в опухоли [17]. Что касается корреляционных связей между ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли, между ИВПА на экспрессию VEGF-A в аденокарциноме и иммуногистохимическими показателями экспрессии эстрогена, прогестерона и маркера пролиферации Ki-67, оказалось, что наиболее выраженной была отрицательная корреляционная связь между ИВПА IL-6, между MCP-1 и маркером пролиферативной активности клеток Ki-67, что характерно для низкодифференцированного варианта опухоли.

Корреляционные связи между ИВПА на продукцию цитокинов в супернатанте опухоли и ИВПА на экспрессию в ней VEGF-A отличались от аналогичных показателей, полученных при исследовании ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови и ИВПА на экспрессию VEGF-A

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ИВПА* НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ИВПА НА ЭКСПРЕССИЮ В НЕЙ VEGF-A, С ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ЭКСПРЕССИЕЙ ЭСТРОГЕНА, ПРОГЕСТЕРОНА И МАРКЕРА ПРОЛИФЕРАЦИИ Ki-67

Исследуемые параметры	Коэффициент корреляции r (p)	Исследуемые параметры	Коэффициент корреляции r (p)
ИВПА IL-1 α – относительное содержание умеренно дифференцированных клеток	0,545 (0,006)	ИВПА IL-2 – ИВПА VEGF-A	0,465 (0,022)
		ИВПА IL-10 – ИВПА VEGF-A	0,450 (0,027)
ИВПА G-CSF – относительное содержание умеренно дифференцированных клеток	0,415 (0,044)	ИВПА G-CSF – ER	0,522 (0,009)
ИВПА GM-CSF – относительное содержание умеренно дифференцированных клеток	0,415 (0,044)	ИВПА G-CSF – PR	0,569 (0,011)
ИВПА TNF α – степень васкуляризации опухоли	0,620 (0,001)	ИВПА MCP-1 – ER	0,467 (0,022)
		ИВПА MCP-1 – PR	0,495 (0,031)
		ИВПА MCP-1 – Ki-67	-0,577 (0,01)
		ИВПА IL-6 – Ki-67	-0,712 (0,001)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов.

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИОННАЯ СВЯЗЬ ИВПА* НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ ИКК КРОВИ С ПАТОГИСТОЛОГИЧЕСКИМИ ПАРАМЕТРАМИ И ИВПА НА ЭКСПРЕССИЮ VEGF-A АДЕНОКАРЦИНОМой МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИЕМ**

Исследуемые параметры		Коэффициент корреляции – r (p)
Супернатант ИВПА*	Патогистологические характеристики опухоли	
IL-1 α / IL-1 β	ИВПА на экспрессию VEGF-A (иммуногистохимический показатель)	0,445 (0,029)
VEGF-A	Количество патмитозов	-0,482 (0,017)
VEGF-A	Количество лимфатических узлов с метастазами	-0,524 (0,009)
MCP-1	Количество митозов	-0,440 (0,032)
IL-17	Показатель инфильтрации макрофагами	0,411 (0,046)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов; ** – иммунокомпетентные клетки.

ТАБЛИЦА 5. КОРРЕЛЯЦИОННЫЕ СВЯЗИ ИВПА* НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В СУПЕРНАТАНТЕ АДЕНОКАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ И ЕЕ МИКРООКРУЖЕНИЯ

ИВПА на продукцию цитокинов		Коэффициент корреляции – r (p)
IL-10	IL-2	0,677 (0,0001)
IL-2	IL-17	0,388 (0,05)
IL-10	IL-8	0,384 (0,025)
IL-8	IL-6	0,837 (0,0001)
IL-8	IL-1ra	0,393 (0,022)
IL-8	G-CSF	0,735 (0,0001)
IL-8	GM-CSF	0,672 (0,0001)
IL-8	MCP-1	0,709 (0,0001)
MCP-1	IL-6	0,732 (0,0001)
IL-6	IL-10	0,343 (0,047)

Примечание. * – индекс влияния поликлональных активаторов.

опухолью (табл. 3, 4). Выявлена прямая корреляционная связь между соотношением ИВПА на продукцию ИКК крови IL-1ra и IL-1β (IL-1ra/IL-1β) и ИВПА на экспрессию VEGF-A аденокарциномой и ее микроокружением, что свидетельствовало о взаимосвязи продукции IL-1ra ИКК крови с экспрессией VEGF-A.

Для определения сопряженности цитокин-продуцирующих резервов опухоли, выявленных при воздействии ПА на ИПР молочной железы, с процессами, протекающими в самой опухоли, оцениваемых по патогистологическим и иммуногистохимическим параметрам, нами было проведено исследование корреляционных связей между величинами ИВПА на продукцию различных цитокинов в супернатанте опухоли (табл. 5). Важно отметить, что в нашем исследовании была выявлена корреляционная связь между ИВПА на продукцию IL-10 и на продукцию IL-6 опухолью и ее микроокружением. В свою очередь, ИВПА на продукцию IL-6 находился в прямой корреляционной связи с ИВПА на продукцию IL-8, а также с экспрессией в опухоли Ki-67.

Обсуждение

Ранее было показано, что индекс влияния ПА, в частности ФГА, на продукцию клетками крови IL-6 повышался при низкодифференцированном варианте опухоли [12]. Поскольку в нашем случае преобладали умеренно дифференцированные варианты опухоли, то это, скорее всего, объясняет полученную отрицательную корреляционную связь между ИВПА на продукцию IL-6 и экспрессией в опухоли Ki-67.

Как известно, роль MCP-1 в развитии опухоли противоречива. С одной стороны, СС хемокины, к которым относится MCP-1, стимулируют

продукцию протеаз опухолевыми клетками и макрофагами, что может вызвать миграцию и пролиферацию опухолевых клеток. При этом низкоуровневая экспрессия MCP-1 способствует развитию опухоли. С другой – высокий уровень экспрессии этого хемокина вызывает торможение роста опухоли, что связывают с участием дендритных клеток и активацией специфического иммунитета [12]. Обратная корреляционная связь, выявленная нами между ИВПА на продукцию MCP-1 ИКК крови и патмитозами, вероятно, объясняется противоречивостью его функций при опухолевой прогрессии. Что касается корреляционной связи между ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови IL-17 и макрофагальной инфильтрации опухоли, то можно предположить, исходя из функций этого цитокина, относящегося к семейству провоспалительных цитокинов, что его способность ингибировать апоптоз опухолевых и эндотелиальных клеток направлена на поддержание воспалительной реакции в очаге неоплазмы.

Выявленная нами прямая корреляционная связь между соотношением ИВПА на продукцию ИКК крови IL-1ra и IL-1β (IL-1ra/IL-1β) и ИВПА на экспрессию VEGF-A аденокарциномой и ее микроокружением, свидетельствует о сопряженности продукции IL-1ra ИКК крови с экспрессией VEGF-A, благодаря чему создаются условия для поддержания неоплазмой воспаления на уровне, необходимом для создания оптимальных условий ее жизнедеятельности, и ингибирования чрезмерно выраженной воспалительной реакции, которая может привести к деструкции опухоли [24]. Не исключено, что этим можно объяснить обратную корреляционную связь между экспрессией VEGF-A и мито-

зами и патмитозами, т.е. за счет рецепторного антагониста IL-1ra обеспечивается необходимый уровень VEGF-зависимой васкуляризации опухоли.

Было показано, что ИВПА на продукцию VEGF-A аденокарциномой находился в прямой корреляционной связи с ИВПА на продукцию IL-2 и IL-10 в супернатанте опухоли. В связи с этим следует отметить, что IL-2 участвует в апоптозе Т-лимфоцитов, в генерации и обеспечении гомеостаза регуляторных Т-клеток, ответственных за толерантность к аутоантигенам, в том числе и к опухолеассоциированным, а также может быть причиной активации апоптоза в антиген-презентирующих цитотоксических лимфоцитов после распознавания ими опухоли как «свое» [16, 27]. Кроме того, выявлена способность IL-2, совместно с IL-12, стимулировать продукцию IL-10 НК-клетками периферической крови и увеличивать продукцию IL-10 Т-регуляторными клетками через активацию фактора транскрипции STAT5 [21, 25]. В свою очередь, IL-10 может подавлять некоторые функции иммунокомпетентных клеток [19].

Таким образом, в результате проведенного исследования было выявлено несколько пересекающихся, разветвляющихся и даже замыкающихся в «круг» цепей корреляционных связей. Одним из примеров такой замкнутой цепи может служить последовательность выявленных нами корреляционных связей: VEGF-A (иммуногисто-

химический показатель экспрессии по ИВПА) — IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) — IL-8 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) — MCP-1 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) — IL-6 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) — IL-10 (ИВПА на продукцию в супернатанте опухоли) — VEGF-A (иммуногистохимический показатель экспрессии по ИВПА).

Полученные данные свидетельствуют о том, что вероятной «привязкой» цитокинпродуцирующих резервов ИКК крови и опухоли с ее микроокружением является другая по сути «кондиционная» среда, в которой накапливаются опухолеассоциированные антигены [9, 12], обладающие способностью, во-первых, супрессировать функциональную активность М1 субпопуляции макрофагов, а во-вторых — «направлять» поляризацию макрофагов в М2-направлении дифференцировки и их активацию, которые подавляют функциональную активность ИКК [26]. Попадая в такую среду ИКК крови, обладающие более высокой функциональной активностью в циркуляторном русле, снижают ее, что характеризуется более низкими ИВПА на продукцию цитокинов, а более высокий уровень ИВПА на продукцию IL-18 в супернатанте, оказывающий прямой или косвенный проонкогенный эффект, объясняется способностью аденокарциномы и ее микроокружения продуцировать этот цитокин.

Список литературы / References

1. Аверкин М.А., Златник Е.Ю., Шапошников А.В., Никипелова Е.А., Геворкян Ю.А. Изучение локального уровня цитокинов при раке толстой и прямой кишки // Сибирский онкологический журнал, 2011. Приложение № 1. С. 7-8. [Averkin M.A., Zlatnik E.Yu., Shaposhnikov A.V., Nikipelova E.A., Gevorkian Yu.A. The study of the local level of cytokines in cancer of the colon and rectum. *Sibirskiy onkologicheskii zhurnal = Siberian Journal of Oncology*, 2011, Suppl. no. 1, pp. 7-8. (In Russ.)]
2. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. М.: Медицина, 1990. 384 с. [Avtandilov G.G. Medical morphometry]. Moscow: Medicine, 1990. 384 p.
3. Антонеева И.И., Абакумова Т.В., Генинг Т.П., Генинг С.О. Динамика изменений уровней цитокинов (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) и их роль в развитии полимодальных локальных и дистантных эффектов при прогрессирующих формах рака яичников // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 4. С. 43-49. [Antoneeva I.I., Abakumova T.V., Gening T.P., Gening S.O. Time course of the cytokine levels (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β) and the role of cytokines in the development of polymodal local and distant effects in progressing forms of ovarian cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 4, pp. 43-49. (In Russ.)]
4. Аутеншлюс А.И., Соснина А.В., Михайлова Е.С., Лыков А.П., Морозов Д.В., Великая Н.В., Фурсов С.А., Вараксин Н.А. Провоспалительные цитокины и регуляторы их активности у больных раком желудочно-кишечного тракта // Цитокины и воспаление, 2009. Т. 8, № 4. С. 18-22. [Autenshlyus A.I., Sosnina A.V., Mikhailova E.S., Lykov A.P., Morozov D.V., Velikaya N.V., Fursov S.A., Varaksin N.A. Proinflammatory cytokines and regulators of their activity in patients with gastrointestinal cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2009, Vol. 8, no. 4, pp. 18-22. (In Russ.)]
5. Аутеншлюс А.И., Соснина А.В., Михайлова Е.С., Морозов Д.В., Вараксин Н.А., Рукавишников М.Ю., Козлова Ю.Н., Каньшина А.В. Цитокины и патогистологическая картина злокачественных новообразований при раке желудочно-кишечного тракта // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11. № 1. С. 29-34. [Autenshlyus A.I., Sosnina A.V., Mikhailova E.S., Morozov D.V., Varaksin N.A., Rukavishnikov M.Yu.,

Kozlova Yu.N., Kanshina A.V. Cytokines and histopathologic pattern of malignant neoplasms in gastrointestinal cancer. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 29-34. (In Russ.) <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2009-1-29-34>

6. Васильева Г.И., Иванова И.А., Тюкавкина С.Ю. Кооперативное взаимодействие моно- и полинуклеарных фагоцитов, опосредованное моно- и нейтрофилокинами // Иммунология, 2000. № 5. С. 11-17. [Vasilyeva G.I., Ivanova I.A., Tyukavkina S.Yu. Cooperative interaction of mono- and polynuclear phagocytes mediated by mono- and neutrophilokines. *Immunologiya = Immunology*, 2000, no. 5, pp. 11-17. (In Russ.)]

7. Гранов А.М., Молчанов О.Е. Канцерогенез и иммунобиология опухоли. Функциональные и клинические аспекты // Вопросы онкологии, 2008. Т. 54, № 4. С. 401-409. [Granov A.M., Molchanov O.E. Carcinogenesis and immunobiology of tumor. Fundamental and clinical aspects. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2008, Vol. 54, no. 4, pp. 401-409. (In Russ.)]

8. Демьянов А.В., Котов А.Ю., Симбирцев А.С. Диагностическая ценность исследования уровней цитокинов в клинической практике // Цитокины и воспаление, 2003. Т. 2, № 3. С. 20-35. [Demyanov A.V., Kotov A.Yu., Simbirtsev A.S. Diagnostic value of cytokine studies in clinical practice. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2003, Vol. 2, no. 3, pp. 20-35. (In Russ.)]

9. Кадагидзе З.Г., Черткова А.И., Славина Е.Г. Регуляторные Т-клетки и их роль в противоопухолевом иммунном ответе // Вопросы онкологии, 2009. Т. 55, № 3. С. 269-277. [Kadagidze Z.G., Chertkov A.I., Slavina E.G. Regulatory T-cells and their role in antitumor immune responses. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2009, Vol. 55, no. 3, pp. 269-277. (In Russ.)]

10. Семинский И.Ж., Серебренникова С.Н., Гузовская Е.В., Семенов Н.В. Роль цитокинов в патогенезе заболеваний // Сибирский медицинский журнал, 2014. Т. 131, № 8. С. 30-33. [Seminsky I.Zh., Serebrennikova S.N., Guzovskaya E.V., Semenov N.V. The role of cytokines in the pathogenesis of diseases. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2014, Vol. 131, no. 8, pp. 30-33. (In Russ.)]

11. Сенников С.В., Силков А.Н., Козлов В.А. Аллельные варианты и изоформы цитокинов в диагностике и патогенезе иммунопатологических состояний // Иммунология, 2002. Т. 23, № 4. С. 243-250. [Sennikov S.V., Silkov A.N., Kozlov V.A. Allele variants and isoforms of cytokines in diagnostics and pathogenesis of immunopathological conditions. *Immunologiya = Immunology*, 2002, Vol. 23, no. 4, pp. 243-250. (In Russ.)]

12. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск: ЗАО ИПП «Офсет», 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlyus A.I. The role of cytokines in the pathogenesis of malignant tumors]. Novosibirsk: ZAO IPP «Offset», 2014. 128 p.

13. Шичкин В.П. Патогенетическое значение цитокинов и перспективы цитокиновой/антицитокиновой терапии // Иммунология, 1998. № 2. С. 9-13. [Shichkin V.P. Pathogenetic significance of cytokines and prospects cytokine/anticytokine therapy. *Immunologiya = Immunology*, 1998, no. 2, pp. 9-13. (In Russ.)]

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

15. Balkwill F. Tumour necrosis factor and cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 2009, Vol. 9, pp. 361-371.

16. Bachmann M.F., Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 1142-1148.

17. Dinarello CA. The role of the interleukin-1-receptor antagonist in blocking inflammation mediated by interleukin-1. *N. Engl. J. Med.*, 2000, Vol. 343, no. 10, pp. 732-734.

18. Grosicki S., Grosicka A., Holowiecki J. Clinical importance of angiogenesis and angiogenic factors in oncohematology. *Wiad. Lek.*, 2007, Vol. 60, no. 1-2, pp. 39-46.

19. Hao N.B., Lu M., Fan Y., Cao Y., Zhang Z., Yang S. Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, no. 948098.

20. Frey A.B., Monu N. Effector-phase tolerance: another mechanism of how cancer escapes antitumor immune response. *Journal of Leukocyte Biology*, 2006, Vol. 79, no. 4, pp. 652-662.

21. Mehrotra P., Donnelly R., Wong S., Kanegane H., Geremew A., Mostowski H., Furuke K., Siegel J., Bloom E. Production of IL-10 by human natural killer cells stimulated with IL-2 and/or IL-12. *J. Immunol.*, 1998, Vol. 160, no. 6, pp. 2637-2644.

22. Park S., Cheon S., Cho D. The Dual Effects of Interleukin-18 in Tumor Progression. *Cellular & Molecular Immunology*, 2007, Vol. 4, no. 5, pp. 329-335.

23. Solberg T., Nearman J., Mullins J., Li S., Baranowska-Kortylewicz J. Correlation between tumor growth delay and expression of cancer and host VEGF, VEGFR2, and osteopontin in response to radiotherapy. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 2008, Vol. 72, no. 3, pp. 918-926.

24. Triozzi P.L., Aldrich W., Singh A. Effects of interleukin-1 receptor antagonist on tumor stroma in experimental uveal melanoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 2011, Vol. 52, no. 8, pp. 5529-5535.

25. Tsuji-Takayama K., Suzuki M., Yamamoto M., Harashima A., Okochi A., Otani T., Inoue T., Sugimoto A., Toraya T., Takeuchi M., Yamasaki F., Nakamura S., Kibata M. The production of IL-10 by human regulatory T cells is enhanced by IL-2 through a STAT5-responsive intronic enhancer in the IL-10 locus. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 6, pp. 3897-3905.

26. Williams C., Yeh E., Soloff A. Tumor-associated macrophages: unwitting accomplices in breast cancer malignancy. *Npj Breast Cancer*, 2016, Vol. 2, no. 15025, pp. 1-12.

27. Witkowska A.M. On the role of sIL-2R measurements in rheumatoid arthritis and cancers. *Mediators Inflamm.*, 2005, Vol. 2005, no. 3, pp. 121-130.

Авторы:

Архипов С.А. — д.б.н., заведующий лабораторией иммуногистохимии, биохимии и фармакологии, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Михайлова Е.С. — старший научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

Кунц Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории патологической физиологии иммунной системы, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Карпущина К.В. — научный сотрудник, Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

Могильная Е.Д. — стажер-исследователь, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Соловьев К.А. — стажер-исследователь, центральная научно-исследовательская лаборатория ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия

Вараксин Н.А. — заведующий лабораторией цитокинов, Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Аутеншилюс А.И. — д.б.н., профессор, заведующий центральной научно-исследовательской лабораторией ГБОУ ВПО «Новосибирский государственный медицинский университет», г. Новосибирск, Россия; главный научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики, Институт молекулярной биологии и биофизики, г. Новосибирск, Россия

Authors:

Arkhipov S.A., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Immunohistochemistry, Biochemistry and Pharmacology, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Mikhailova E.S., Senior Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Kunts T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Pathological Physiology of Immune System, Central Research Laboratory of Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Karpukhina K.V., Research Associate, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Mogilnaya E.D., Research Intern, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation.

Solovyev K.A., Research Intern, Central Research Laboratory of Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation

Varaksin N.A., Head, Cytokine Laboratory, Joint Stock Company "Vector-Best", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Autenshlyus A.I., PhD, MD (Biology), Professor, Head, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Main Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 03.06.2016
Принята к печати 20.06.2016

Received 03.06.2016
Accepted 20.06.2016

ИССЛЕДОВАНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА (TLR2, TLR4 И HBD1) В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ УРЕТРЫ ПРИ ХРОНИЧЕСКОМ БАКТЕРИАЛЬНОМ ЦИСТИТЕ

Свитич О.А.^{1,2}, Ганковская Л.В.¹, Беренштейн А.В.¹,
Перепапова Т.С.³, Волкова Е.М.³

¹ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия

³ Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Цель: исследование экспрессии генов TLR2, TLR4 и HBD-1 в эпителиальных клетках слизистой уретры у женщин с хроническим бактериальным циститом и у здоровых женщин. Материалы и методы: Из образцов слизистой уретры была выделена РНК, далее проводили ОТ-ПЦР. Результаты: У женщин с хроническим бактериальным циститом было выявлено увеличение экспрессии генов TLR2 в 6,9 раз, TLR4 в 2,6 раз, а также снижение экспрессии гена HBD1 в 13,6 раз в сравнении со здоровыми женщинами. Спустя 6 месяцев после комбинированной терапии с применением аутологичного комплекса иммунопептидов у больных циститом наблюдалась нормализация показателей уровня экспрессии генов TLR2, TLR4 и HBD1 до аналогичных в группе здоровых женщин. Заключение: У больных хроническим циститом был выявлен дисбаланс в экспрессии генов врожденного иммунитета на уровне слизистой уретры, способствующий более высокой подверженности заболеваниям мочевыводящих путей.

Ключевые слова: врожденный иммунитет, слизистая оболочка, инфекции мочевыводящих путей, Toll-подобные рецепторы, дефенсин

STUDIES OF INNATE IMMUNITY PARAMETERS (TLR2, TLR4 AND HBD1) OF URETHRAL MUCOUS EPITHELIUM IN CHRONIC BACTERIAL CYSTITIS

Svitich O.A.^{a,b}, Gankovskaya L.V.^a, Berenshtein A.V.^a, Perepanova T.S.^c,
Volkova E.M.^c

^a N. Pyrogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

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

^c A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The study for quantitation of TLR2, TLR4 and HBD-1 gene expression in urethral mucosal epithelium from women with chronic bacterial cystitis and healthy females. Materials and methods: RNA

Адрес для переписки:

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

Образец цитирования:

О.А. Свитич, Л.В. Ганковская, А.В. Беренштейн,
Т.С. Перепапова, Е.М. Волкова «Исследование показателей
врожденного иммунитета (TLR2, TLR4 и HBD1)
в эпителиальных клетках слизистой оболочки уретры при
хроническом бактериальном цистите» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 469-474.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-469-474

© Свитич О.А. и соавт., 2016

Address for correspondence:

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

For citation:

O.A. Svitch, L.V. Gankovskaya, A.V. Berenshtein,
T.S. Perepanova, E.M. Volkova "Studies of innate immunity
parameters (TLR2, TLR4 and HBD1) of urethral mucous
epithelium in chronic bacterial cystitis", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 5,
pp. 469-474. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-469-474

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-469-474>

was extracted from the samples of urethral mucosa followed by RT-PCR. Results: increased expression of TLR2, TLR4 (respectively, 6.9-, 2.6-fold), along with 13.6-fold decrease in HBD-1 was revealed in women with chronic bacterial cystitis, as compared with appropriate parameters in normal women. Six months later, after combined therapy with autologous immunopeptide complex, TLR2, TLR4 и HBD1 expression levels proved to be near-normal in the patients, being similar to those in healthy females. Conclusion: Imbalanced expression of genes controlling innate immunity was revealed in urethral mucosa of the patients with chronic cystitis, thus increasing risk for urinary tract infections.

Keywords: innate immunity, mucosa, urinary tract infections, Toll-like receptors, defensins

Введение

Защита организма от инфекции осуществляется системой адаптивного и врожденного иммунитета. Особую роль в развитии воспаления играют рецепторы врожденного иммунитета — Toll-подобные рецепторы (TLRs). TLRs активируются путем распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов (PAMPs), что приводит к запуску внутриклеточных сигнальных каскадов, активации транскрипционных факторов и индукции синтеза цитокинов, хемокинов и противомикробных пептидов [10].

В защите слизистых оболочек от внедряющихся патогенов важную роль играет система врожденного иммунитета, которая реагирует на внедрение патогенов и реализует воспалительный ответ при помощи TLRs. При скоординированном функционировании механизмов врожденного иммунитета происходит элиминация патогена. Известно, что большинство инфекций начинается с проникновения патогена через слизистую оболочку [3]. В развитии хронического цистита значительную роль играет дисбаланс факторов врожденного иммунитета, из которых наиболее значимыми при инфекции мочевыводящих путей являются мембранные рецепторы TLR-2 и TLR-4 и противомикробный пептид β -дефензин-1 (HBD-1).

Хронические рецидивирующие инфекции мочевыводящих путей (ИМП) чрезвычайно распространены среди молодых женщин. Предыдущие исследования подтверждают, что у 27-44% женщин, перенесших первичный эпизод ИМП, развивается рецидивирующая инфекция [5]. Ряд исследований в течение нескольких десятилетий указывают на генетические факторы, которые могут влиять на предрасположенность к урогенитальным инфекциям [8, 9].

Лечение инфекций мочевыводящих путей требует длительного применения антибиотиков широкого спектра, что часто приводит к развитию лекарственной резистентности [7]. Как следствие, лечение ИМП, особенно рецидивирующих, становится сложной клинической проблемой [5]. Последнее время разрабатыва-

ются новые подходы в лечении ИМП на основе регуляции врожденного иммунитета слизистых.

Комплексное исследование компонентов врожденного иммунитета на уровне экспрессии генов распознающих рецепторов и противомикробных пептидов в слизистой оболочке уретры у женщин с хроническими рецидивирующими циститами позволит определить их роль в защите слизистой мочевыводящих путей.

Цель: исследование показателей врожденного иммунитета на уровне экспрессии генов TLR2, TLR4 и HBD1 в эпителиальных клетках слизистой оболочки уретры и у здоровых женщин, и у женщин с хроническим бактериальным циститом до и после курса комбинированной терапии.

Материалы и методы

Было проведено лабораторное исследование пациентов контрольной группы ($n = 10$) и группы женщин с хроническим бактериальным циститом ($n = 40$). Контрольную группу составили здоровые женщины в возрасте 24-53 лет без хронических и инфекционно-воспалительных заболеваний. В группу женщин с хроническим бактериальным циститом ($n = 40$) были включены женщины в возрасте 19-54 лет с диагнозом «рецидивирующий бактериальный цистит», продолжительность болезни в среднем составляла 3,5 года, и количество обострений от 1 до 10 раз в год. Обследуемые в группе с хроническим циститом регулярно получали антимикробную терапию, включавшую следующие препараты: фосфомицина триметамол, фуразидина калиевую соль, норфлоксацин, левофлоксацин, цефиксим, цефтибутен, амоксиклав и др. Из 40 обследуемых женщин, больных хроническим циститом, была выделена группа пациенток ($n = 13$), к которым наряду со стандартной схемой лечения применялась комбинированная терапия, включавшая в себя инстилляцию аутологичного комплекса иммунопептидов (АКИ) непосредственно в уретру и мочевого пузырь пациенток, АКИ был получен ранее из периферической крови женщин с хроническим бактериальным циститом.

Микробиологический анализ мочи определялся на базе ФГБУ «НИИ урологии». В анализах

мочи у женщин с хроническим циститом выявлены следующие возбудители: *E. coli* в монокультуре у 14 женщин (40%), *E. coli*, *Staphylococcus spp* и *E. coli*, *Enterococcus faecalis* и *E. coli*, *Citrobacter freundii* в смешанной культуре обнаружена у 7 женщин (20%), *Enterococcus faecalis* в монокультуре у 4 женщин (11,4%). У 25,7% обследуемых в культуральном анализе мочи рост патогенной флоры определялся в незначительном титре.

Клинический материал забирался из уретры с помощью урогенитального зонда типа «А» (Jiangsu SUYUN Medical Materials, Китай). Из образцов эпителиальных клеток слизистой уретры была выделена РНК с использованием комплекта реагентов «РИБО-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия), строго по протоколу. Для определения уровня экспрессии генов TLR2, TLR4 и HBD1 была получена кДНК с помощью реакции обратной транскрипции. На следующем этапе исследования с полученной в результате реакции ОТ кДНК проводили полимеразную цепную реакцию в режиме реального времени (ПЦР-РВ) на приборе ДТ-96 (ДНК-Технология, РФ). Реакция проводилась с использованием «Комплекта реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии интеркалирующего красителя SYBR Green I» (Синтол, РФ). Последовательность праймеров для определения уровня экспрессии данных генов подбирали с помощью программы Vector NTI 8.0 (последовательности мРНК были получены в базе данных Gene Bank). Системы для определения экспрессий генов TLR2, TLR4 и HBD1 были отработаны ранее [3]. Определение уровня экспрессии исследуемых генов проводилось относительно экспрессии гена β -актина [1]. Данные по экспрессии исследуемых генов представлены в виде десятичного логарифма от числа копий соответствующего гена относительно 10^6 копий гена актина. Достоверность рассчитана по непараметрическому методу Манна–Уитни ($p \leq 0,05$) [2].

Результаты

На первом этапе работы в клетках слизистой уретры здоровых женщин была определена экспрессия генов молекул врожденного иммунитета: TLR2, TLR4 и HBD1. Уровень экспрессии генов паттерн-распознающих рецепторов TLR2, TLR4 и гена противомикробного пептида HBD1 в группе здоровых женщин составил $5,83 \pm 0,31$, $4,34 \pm 0,21$ и $7,98 \pm 0,34$ соответственно (рис. 1). Нами был проанализирован уровень экспрессии генов TLR2, TLR4 и HBD1. Уровень экспрессии генов TLR2, TLR4 и HBD1 в эпителиальных

клетках слизистой уретры в группе женщин с диагнозом хронического рецидивирующего бактериального цистита составил $6,67 \pm 0,27$; $4,75 \pm 0,39$ и $6,87 \pm 0,59$ соответственно (рис. 1).

У 90% обследованных женщин в группе с хроническим бактериальным циститом выявлено достоверное увеличение числа копий гена TLR2 в 7 раз по сравнению с показателями группы здоровых доноров (рис. 1А). У 10% пациенток было выявлено незначительное снижение уровня экспрессии гена TLR2 в 0,72 раз ($5,69 \pm 0,32$), однако, достоверных отличий от показателей здоровых женщин обнаружено не было.

Анализ уровня экспрессии гена TLR4 показал достоверное увеличение числа копий данного гена в 2,6 раз у 78,5% пациенток с хроническим бактериальным циститом по сравнению с показателями группы здоровых женщин. Экспрессия гена TLR4 у пациенток с диагнозом хронического рецидивирующего цистита составила $4,75 \pm 0,39$ и $4,34 \pm 0,21$ в группе здоровых женщин (рис. 1Б). У 22,5% обследованных обнаружилось достоверное снижение уровня экспрессии гена TLR4 по сравнению с контрольной группой в 7,4 раза ($3,44 \pm 0,33$). Корреляция между снижением уровня экспрессии гена TLR4 у 22,5% больных циститами и не отличающимися от здоровых женщин показателями экспрессии гена TLR2 не обнаружена.

Экспрессия гена HBD1 в слизистой уретры достоверно снижена в 13,5 раз у всех обследованных женщин с хроническим бактериальным циститом по сравнению с контрольной группой женщин. В группе здоровых женщин уровень экспрессии гена β -дефензина-1 составил $7,98 \pm 0,34$, в группе больных циститами – $6,87 \pm 0,59$ (рис. 1В).

В группе пациенток, получавших комплексное лечение с применением аутологичного комплекса иммунопептидов (АКИ), был проведен сравнительный анализ уровня экспрессии генов TLR2, TLR4 и HBD1 в эпителиальных клетках слизистой уретры через 1 месяц и через 6 месяцев после курса комбинированной терапии АКИ. Получение АКИ из периферической крови пациенток проводилось согласно медицинской технологии «Метод персонифицированной иммунотерапии» (ФС № 2011/212 от 28.07.2011 г.), разрешенной к применению Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения.

Спустя 1 месяц после лечения АКИ уровень экспрессии TLR2 повышался в 2,1 раза по сравнению с исходными показателями. Через полгода после курса терапии уровень экспрессии гена TLR2 в среднем составил $5,49 \pm 0,22$ и приближал-

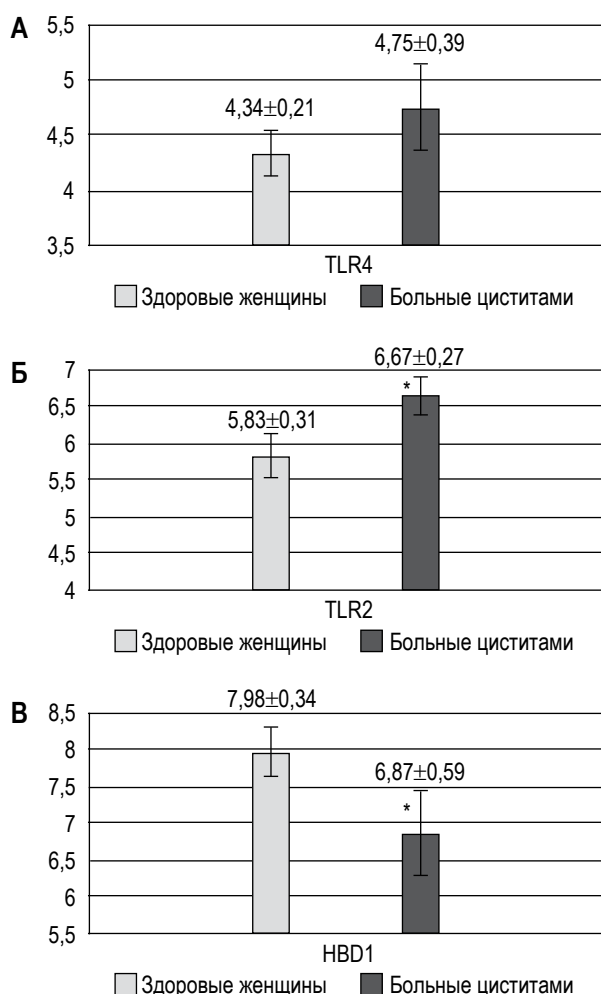


Рисунок 1. Уровень экспрессии генов TLR2 (А), TLR4 (Б) и HBD1 (В) эпителиальными клетками слизистой уретры у больных хроническим циститом и в группе здоровых женщин

Примечание. По оси абсцисс: контрольная группа и группа больных хроническим циститом; по оси ординат: десятичный логарифм экспрессии гена HBD1 в группе больных циститом относительно 10^6 копий гена актина; * – значения достоверно отличаются от контрольной группы ($p \leq 0,05$).

ся к нормальным значениям в группе здоровых женщин (рис. 2А). Анализ уровня экспрессии гена TLR4 в динамике показал следующие результаты: $4,61 \pm 0,63$ после одного месяца лечения и $4,02 \pm 0,04$ через 6 месяцев после лечения (рис. 2Б).

В отношении гена β -дефензина-1 также была обнаружена положительная динамика в сторону приближения показателей экспрессии данного гена в группе пациенток с хроническим бактериальным циститом к аналогичным в группе здоровых женщин. Экспрессия гена HBD1 эпителиальными клетками слизистой уретры после 1 месяца комплексной терапии составила $7,39 \pm 0,22$ (рис. 2В). Спустя 6 месяцев после про-

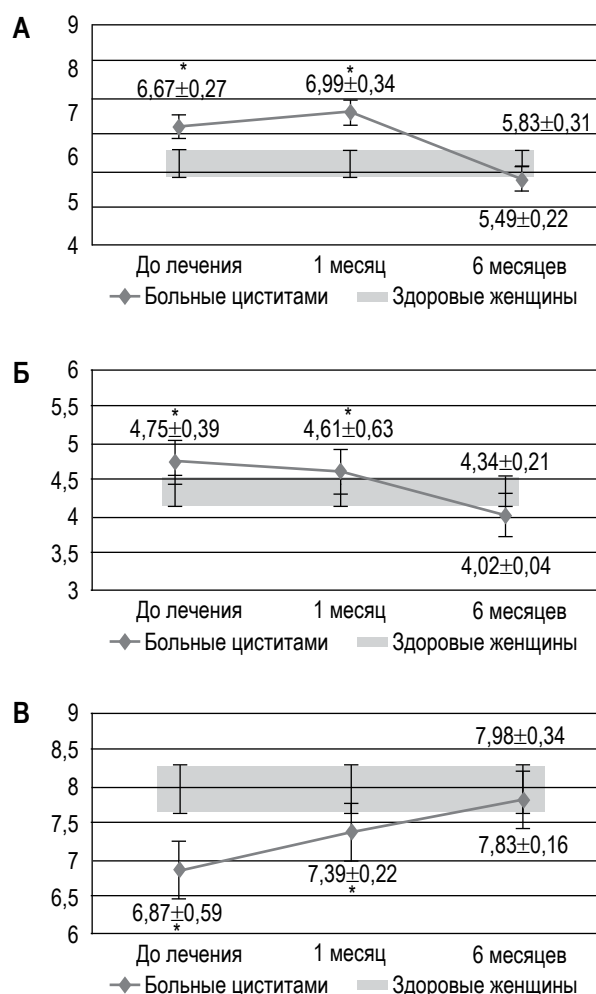


Рисунок 2. Динамика уровня экспрессии генов TLR2 (А), TLR4 (Б) и HBD1 (В) эпителиальными клетками слизистой уретры у женщин после курса комбинированной терапии по сравнению с группой здоровых женщин

Примечание. По оси ординат: десятичный логарифм экспрессии гена HBD1 относительно 1 млн копий гена актина; * – значения достоверно отличаются от контрольной группы ($p \leq 0,05$).

веденного курса терапии анализ уровня экспрессии гена HBD1 в исследуемой группе пациенток показал значительное увеличение уровня экспрессии в 9 раз ($7,83 \pm 0,16$) по сравнению с исходным значением до начала лечения ($6,87 \pm 0,59$).

Спустя 6 месяцев после курса лечения АКИ уровень экспрессии генов TLR2, TLR4 по сравнению с исходными показателями снижался в 14,9 и 5,2 раз соответственно, а уровень экспрессии гена β -дефензина-1 увеличивался в 9 раз по сравнению с исходными показателями. Таким образом, после курса терапии АКИ наблюдалась нормализация показателей уровня экспрессии распознающих рецепторов и противомикробного пептида.

Обсуждение

В данном исследовании в эпителиальных клетках слизистой уретры здоровых женщин была определена экспрессия генов распознающих рецепторов (TLR2, TLR4) и противомикробного пептида (HBD1). Ранее другими исследователями на мышинной модели было показано, что гены TLR2 и TLR4 конститутивно экспрессируются в эпителии мочевыводящих путей и уровень их экспрессии может увеличиваться под действием PAMPs и цитокинов [14]. Samuelson с соавт. данными проточной цитофлуориметрии подтвердили экспрессию молекулы TLR4 у здоровых индивидов в мочевом пузыре, мочеточниках, почечных лоханках [11].

Экспрессия генов TLR2 и TLR4 в группе женщин с диагнозом хронического бактериального цистита по сравнению с группой здоровых женщин увеличена в 7 и 2,6 раз соответственно. Рядом авторов было показано, что воспалительные процессы в почках приводят к выраженному повышению уровня экспрессии генов TLR2 и TLR4 в клетках эпителия дистальных канальцев, собирательных трубочек и петель Генле [14]. Это подтверждает полученные нами результаты по изменению уровня экспрессии данных генов в эпителии слизистой уретры больных циститом.

В зарубежной литературе имеются данные об изменении уровня экспрессии распознающих рецепторов и противомикробных пептидов на белковом уровне при различных инфекционных заболеваниях мочеполовой системы. Также имеются публикации о ряде полиморфизмов данных генов, влияющих на предрасположенность к развитию ИМП [6, 12]. Ряд авторов показали увеличение синтеза мРНК генов TLR2 и TLR4 в эпителиальных клетках мочевыводящих путей на экспериментальной модели мышей с циститом [14].

В ходе данной работы было обнаружено, что у больных хроническим циститом экспрессия гена HBD1 снижена в 13,5 раз по сравнению с группой здоровых женщин. Последние исследования демонстрируют, что экспрессия генов противомикробных пептидов (ПМП) может

быть индуцирована рядом факторов. ПМП могут экспрессироваться как конститутивно, так и индуцировано, под воздействием цитокинов, вырабатываемых моноцитами, привлеченными в воспалительный очаг [15]. В работах других исследователей было показано, что в норме экспрессия мРНК гена *DEFB1* на высоком уровне выявлена в дистальных нефронах, собирательной системе почек, а также в дистальном отделе уретры [4, 13], что свидетельствует о важной роли данного пептида в поддержании здорового состояния слизистой оболочки мочевыводящих путей.

В ходе данной работы у женщин с хроническим бактериальным циститом было выявлено нарушение врожденного иммунитета на уровне слизистых, проявляющееся повышением уровня экспрессии генов TLR2 и TLR4 и понижением экспрессии гена HBD1. Значительное увеличение экспрессии TLRs и одновременное снижение экспрессии гена β -дефензина-1 эпителиальными клетками уретры в совокупности способствует развитию хронического цистита и более высокой подверженности заболеваниям урогенитального тракта. Использование комбинированной терапии с применением аутологичного комплекса иммунопептидов позволило сократить количество рецидивов у женщин с хроническим бактериальным циститом, что сочеталось с нормализацией показателей уровня экспрессии генов врожденного иммунитета.

Таким образом, разработан новый подход к оценке врожденного иммунитета слизистых оболочек мочевыводящих путей, который заключается в оценке экспрессии генов распознающих рецепторов врожденного иммунитета (TLR2 и TLR4) и противомикробного пептида (HBD1), экспрессируемых на слизистых оболочках мочевыводящих путей. Это дает возможность прогнозировать предрасположенность к развитию хронического цистита у лиц со снижением экспрессии HBD1 и повышением экспрессии рецепторов врожденного иммунитета (TLR2 и TLR4), проводить диагностику и контроль проводимого лечения.

Список литературы / References

1. Ганковская О.А., Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В. Роль Toll-подобных рецепторов и дефенсинов в противомикробной защите урогенитального тракта женщин // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии, 2008. №1. С.46-50. [Gankovskaya O.A., Koval'chuk L.V., Gankovskaya L.V., Lavrov V.F., Romanovskaya V.V., Kartashov D.D., Fenzeleva V.A. Role of Toll-like receptors and defensins in antimicrobial protection of urogenital tract in females. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology, Immunobiology*, 2008, no. 1, pp. 46-50. (In Russ.)]
2. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glants S. Medical-biological statistics]. Moscow: Practice, 1998. 459 p.
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2011. 640 с. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkov R.J.

Clinical immunology and allergology with the basics of fundamental immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011. 640 p.

4. Becknell B., Spencer J.D., Carpenter A.R. Expression and antimicrobial function of beta-defensin 1 in the lower urinary tract. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 10, e77714.

5. Foxman B. Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors. *Am. J. Public Health*, 1990, Vol. 80, no. 3, pp. 331-333.

6. Hagberg L., Hull R., Hull S. Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice. *Infect. Immun.*, 1984, Vol. 46, no. 3, pp. 839-844.

7. Hawn T.R., Scholes D., Li S.S. Toll-like receptor polymorphisms and susceptibility to urinary tract infections in adult women. *PLoS One*, 2009, Vol. 4, no. 6, e5990.

8. Hooton T.M., Scholes D., Hughes J.P. A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N. Engl. J. Med.*, 1996, Vol. 335, no. 7, pp. 468-474.

9. Ikäheimo R., Siitonen A., Heiskanen T. Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women. *Clin. Infect. Dis.*, 1996, Vol. 22, no. 1, pp. 91-99.

10. Medzhitov R., Preston-Hurlburt P., Janeway C.A.Jr. A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*, 1997, Vol. 388, no. 6640, pp. 394-397.

11. Samuelsson P., Hang L., Wullt B. Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect. Immun.*, 2004, Vol. 72, no. 6, pp. 3179-3186.

12. Song J., Abraham S.N. Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 38, Suppl. 2, pp. 21-28.

13. Townes C.L., Ali A., Robson W. Tolerance of bacteriuria after urinary diversion is linked to antimicrobial peptide activity. *Urology*, 2011, Vol. 77, no. 2, p. 509, e1-8.

14. Wolfs T.G., Buurman W.A., van Schadewijk A. *In vivo* expression of Toll-like receptor 2 and 4 by renal epithelial cells: IFN-gamma and TNF-alpha mediated up-regulation during inflammation. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 3, pp. 1286-1293.

15. Zasloff M. Antimicrobial peptides, innate immunity, and the normally sterile urinary tract. *J. Am. Soc. Nephrol.*, 2007, Vol. 18, no. 11, pp. 2810-2816.

Авторы:

Свитич О.А. — д.м.н., заведующая лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»; ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковская Л.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой иммунологии МБФ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Беренштейн А.В. — дипломник кафедры иммунологии МБФ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Перепанова Т.С. — д.м.н., профессор, заведующая отделом инфекционно-воспалительных заболеваний и клинической фармакологии Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва

Волкова Е.М. — аспирант Научно-исследовательский институт урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина, филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва

Authors:

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

Gankovskaya L.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology, Faculty of Medical Biology, N. Pyrogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Berenshtein A.V., Graduate Student, Department of Immunology, Faculty of Medical Biology, N. Pyrogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Perepanova T.S., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Inflammatory Diseases, A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology, Branch of National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russian Federation

Volkova E.M., Postgraduate Student, A. Lopatkin Research Institute of Urology and Interventional Radiology, Branch of National Medical Research Radiological Center, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.02.2016
Принята к печати 26.05.2016

Received 01.02.2016
Accepted 26.05.2016

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОЙ РЕГУЛЯЦИИ РЕСПИРАТОРНОГО ВЗРЫВА НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ АБДОМИНАЛЬНОГО СЕПСИСА У БОЛЬНЫХ РАСПРОСТРАНЕННЫМ ГНОЙНЫМ ПЕРИТОНИТОМ

Савченко А.А.^{1,2}, Борисов А.Г.^{1,2}, Здзитовецкий Д.Э.², Гвоздев И.И.¹

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

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

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей взаимосвязи уровней концентрации цитокинов и параметров респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных распространенным гнойным перитонитом (РГП). Обследовано 50 больных РГП. Забор крови для проведения исследования осуществляли в 1-ые сутки госпитализации. С 5 по 10 сутки послеоперационного периода у 35 больных (70,0%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30,0%) осложнения отсутствовали. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей. Определение уровней концентраций цитокинов осуществляли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа. Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. Установлено, что у больных РГП на фоне повышения уровней провоспалительных цитокинов и IFN γ в сыворотке увеличивается интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов крови за счет активации синтеза как первичных, так и вторичных активных форм кислорода (АФК). У больных РГП, у которых в динамике послеоперационного периода разовьется абдоминальный сепсис, хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови характеризуется пониженным уровнем спонтанного синтеза первичных АФК и повышенным уровнем спонтанного синтеза вторичных АФК. Уровни синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами при индукции респираторного взрыва зимозаном незначительно различаются в группах больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса в послеоперационном периоде. У больных РГП, у которых не будет осложнений в послеоперационном периоде, сохраняется доминирование регуляции IFN γ активности респираторного взрыва нейтрофилов. У больных, послеоперационный период которых осложнится абдоминальным сепсисом, активность дыхательного взрыва нейтрофилов регу-

Адрес для переписки:

Савченко Андрей Анатольевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера»
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел./факс: 8 (391) 228-06-33.
E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Address for correspondence:

Savchenko Andrey A.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zeleznyak str., 3g.
Phone/Fax: 7 (391) 228-06-33.
E-mail: aasavchenko@yandex.ru

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий,
И.И. Гвоздев «Особенности цитокиновой регуляции
респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе
развития абдоминального сепсиса у больных
распространенным гнойным перитонитом»
// Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 475–482.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482

© Савченко А.А. и соавт., 2016

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, D.E. Zdzitovetsky, I.I. Gvozdev
“Cytokine regulation of respiratory burst in blood neutrophils for
prediction of abdominal sepsis in patients with extended purulent
peritonitis”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya*
Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 475–482.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-475-482

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-475-482>

лируется TNF α и IL-6. Предполагается, что стимулирующее влияние IFN γ и ингибирующее воздействие TNF α и IL-6 на респираторный взрыв нейтрофилов крови у больных РГП связано с выбросом большого количества цитокинов в динамике острого иммуновоспалительного процесса и миграцией активированных клеток в очаг воспаления. Именно изменение уровня цитокинов, регулирующих респираторный взрыв нейтрофилов, и является важным фактором, прогнозирующим развитие абдоминального сепсиса при РГП.

Ключевые слова: нейтрофилы, цитокины, респираторный взрыв, регуляция, перитонит, сепсис

CYTOKINE REGULATION OF RESPIRATORY BURST IN BLOOD NEUTROPHILS FOR PREDICTION OF ABDOMINAL SEPSIS IN PATIENTS WITH EXTENDED PURULENT PERITONITIS

Savchenko A.A.^{a, b}, Borisov A.G.^{a, b}, Zdzitovetsky D.E.^b, Gvozdev I.I.^a

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

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

Abstract. The aim of this study was to evaluate correlations between cytokine concentrations and parameters of respiratory burst in blood neutrophils, in order to predict potential development of abdominal sepsis in the patients with extended purulent peritonitis (EPP). The study involved fifteen patients with EPP. Peripheral blood samples were taken on the first day post-admission. Abdominal sepsis was diagnosed in thirty-five patients (70%) within 5...10 days after surgical intervention. Clinical complications were absent in fifteen patients (30%). Sixty-seven healthy individuals were examined as a control group. Evaluation of the cytokine concentrations was performed by ELISA technique. The degree of respiratory burst in blood neutrophils was measured by means of chemiluminescence assay.

It is revealed that the EPP patients exhibited increased levels of serum proinflammatory cytokines and IFN γ , along with higher intensity of respiratory burst in blood neutrophils, due to activated synthesis of both primary and secondary reactive oxygen species (ROS). The EPP patients who later developed abdominal sepsis showed reduced spontaneous synthesis of primary ROS and increased spontaneous synthesis of secondary ROS. Upon zymosan induction of neutrophils, both primary and secondary ROS levels proved to be similar in the EPP subgroups with or without subsequent sepsis. EPP patients with uncomplicated post-surgical period still exhibited a predominant regulation of respiratory burst of neutrophils by IFN γ activity. Meanwhile, the neutrophil respiratory burst was correlated with TNF α and IL-6 in those patients who further developed abdominal sepsis. A stimulatory effect of IFN γ and a presumably inhibitory action of TNF α and IL-6 upon respiratory burst of blood neutrophils in EPP patients are associated with a release of large cytokine amounts during acute immune inflammatory events, and migration of activated cells to the inflammatory focus. In particular, the changes in the cytokine levels regulating the respiratory burst of neutrophils may be an important factor which predicts development of abdominal sepsis in EPP.

Keywords: neutrophils, cytokines, respiratory burst, regulation, peritonitis, sepsis

Исследование выполнено при финансовой поддержке Краевого государственного автономного учреждения «Красноярский краевой фонд поддержки научной и научно-технической деятельности».

Введение

Нейтрофильные гранулоциты являются высокореактивными клетками иммунной системы. Они быстро мобилизуются в очаг воспаления, от их фагоцитарной активности во многом за-

висит эффективность противомикробной защиты организма [3, 11]. Обладая широким набором рецепторов, нейтрофилы очень чувствительны к окружающей среде и при малейшем нарушении гомеостаза модулируют свои функции, направленные на его восстановление. Доказано, что нейтрофилы способны с помощью гуморальной регуляции (цитокины и другие регуляторные молекулы) и через межклеточные контакты встраиваться в кооперацию с другими клетками иммунной системы в механизмы иммуновоспа-

лительного ответа [1, 10]. В то же время активированные нейтрофилы осуществляют не только эффекторные функции, направленные на элиминацию чужеродного антигена, но и за счет синтеза широкого спектра цитокинов способны стимулировать регуляторные процессы, обеспечивающие развитие воспаления и реакции адаптивного иммунитета [3, 14].

Одним из важных аспектов проявления функциональной активности нейтрофилов является респираторный взрыв, развивающийся при взаимодействии клеток с объектами фагоцитоза, интенсивность которого формируется синтезом активных форм кислорода (АФК) [8, 12]. Хемилюминесцентный анализ, на основе взаимодействия хемилюминесцентных индикаторов с активными формами кислорода, позволяет охарактеризовать различные параметры респираторного взрыва и тем самым оценить уровень реактивности нейтрофильных гранулоцитов [4, 7].

У больных распространенным гнойным перитонитом (РГП) развивается мощная воспалительная реакция, эффективность которой во многом определяет тяжесть течения и исход заболевания. Клиническое состояние больных РГП во многом сопряжено с регуляторным дисбалансом в иммунной системе, который реализуется значительным повышением уровня различных цитокинов, стимулирующих воспалительные процессы [4, 5]. Можно предположить, что нарушение регуляторных процессов в иммунной системе и, как следствие этого, изменение функциональной активности фагоцитирующих клеток определяет риск развития абдоминального сепсиса как осложнения РГП.

Целью исследования явилось изучение особенностей взаимосвязи уровней концентрации цитокинов и параметров респираторного взрыва нейтрофилов крови в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных РГП.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находились 50 больных с РГП (22 мужчин и 28 женщин) внебольничного и госпитального происхождения, проходивших лечение в отделении гнойной хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КГБУЗ «КМКБСМП имени Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $54,2 \pm 19,2$ года. Из исследования были исключены больные, у которых РГП был осложнением панкреонекроза, неоперабельных онкологических заболеваний органов брюшной

области и неоперабельного нарушения мезентериального кровообращения. Исходную степень тяжести больных определяли по шкале SAPSII [4]. Тяжесть РГП исходно определяли по Мангеймскому индексу перитонита и индексу брюшной полости [2, 4]. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [15]. При оценке тяжести синдрома системной воспалительной реакции мы придерживались критериев ACCP/SCCM [6]. Забор крови для проведения исследования осуществляли в 1-ые сутки госпитализации. С 5 по 10 сутки послеоперационного периода у 35 больных (70,0%) развился абдоминальный сепсис, у 15 больных (30,0%) осложнения отсутствовали. В качестве контроля обследовано 67 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Определение уровней концентраций интерлейкина-1 (IL-1 β), интерлейкина-4 (IL-4), интерлейкина-6 (IL-6), интерферона- γ (IFN γ) и фактора некроза опухоли- α (TNF α) осуществляли с помощью твердофазного иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск).

Состояние респираторного взрыва нейтрофильных гранулоцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [3]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе «CL3606» (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Сспонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Сспонт.).

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 независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Для исследования силы взаимосвязей показателей вычислялся коэффициент ранговой корреляции по Спирмену. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РГП В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ СЕПСИСА (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели	Контроль n = 67		Без последующего развития сепсиса n = 15		С последующим развитием сепсиса n = 35	
	1		2		3	
	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$	Me	$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$
IL-1 β , пг/мл	1,00	0,01-4,50	9,50	9,00-11,00	10,60	8,85-12,25
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$	
IL-4, пг/мл	0,01	0,01-1,05	0,85	0,01-2,70	0,75	0,01-2,85
IL-6, пг/мл	4,00	1,66-11,42	144,5	130,0-290,0	200,5	32,0-275,0
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$	
IFN γ , пг/мл	17,93	7,02-36,56	34,56	18,45-76,75	66,78	47,07-107,8
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} = 0,040$	
TNF α , пг/мл	2,75	0,75-30,36	19,00	10,00-50,00	29,50	10,50-145,0
			$p_{1-2} = 0,030$		$p_{1-3} < 0,001$	

Примечание. p_1 – статистически значимые различия с показателями контрольной группы;
 p_2 – статистически значимые различия с показателями больных РГП, у которых не будет сепсиса.

Результаты

Исследование уровней концентрации цитокинов позволило установить, что независимо от развития или неразвития сепсиса у больных РГП по сравнению с контрольными значениями повышено содержание IL-1 β , IL-6, IFN γ и TNF α (табл. 1). Однако концентрация IFN γ в сыворотке крови больных РГП, у которых в послеоперационном периоде развился абдоминальный сепсис, значительно выше, чем у пациентов без осложнений.

При исследовании люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови обнаружено, что независимо от развития абдоминального сепсиса при РГП уменьшено время выхода на максимум спонтанной хемилюминесценции (табл. 2). При этом только у больных, у которых не будет сепсиса, повышен максимум интенсивности спонтанной люцигенин-зависимой хемилюминесценции относительно контрольных значений и выявленных у лиц с последующим осложнением. Независимо от развития осложнения у больных РГП повышен максимум интенсивности, но снижена площадь под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов. Только у больных с отсутствием в послеоперационном периоде сепсиса снижен индекс активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови относительно контрольного уровня и значений, выяв-

ленных у пациентов с последующим развитием сепсиса.

Известно, что люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная АФК и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [4, 13]. В то же время бактерицидная активность нейтрофилов также определяется и уровнем синтеза вторичных форм кислорода [3]. Для оценки суммарного уровня синтеза и первичных, и вторичных АФК мы определяли показатель люминол-зависимой хемилюминесценции.

Обнаружено, что максимум интенсивности люминол-зависимой спонтанной хемилюминесценции нейтрофилов при РГП повышен относительно контрольных значений (см. табл. 2). При этом у больных с отсутствием осложнений послеоперационного периода максимум интенсивности данной кривой выше, чем у пациентов, у которых развивается сепсис. Максимум интенсивности зимозан-индуцированной и индекс активации люминол-зависимой хемилюминесценции повышен у больных РГП относительно контрольных значений независимо от развития осложнений в послеоперационном периоде. В то же время, площадь под кривой люминол-зависимой индуцированной хемилюминесценции нейтрофилов повышена только у больных, у которых в послеоперационном периоде развивается абдоминальный сепсис.

**ТАБЛИЦА 2. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ РГП
В ПРОГНОЗЕ РАЗВИТИЯ СЕПСИСА (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)**

Показатели	Контроль n = 67		Без последующего развития сепсиса n = 15		С последующим развитием сепсиса n = 35	
	1		2		3	
	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}	Me	Q _{0,25} -Q _{0,75}
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	2718	2010-3791	1651	1193-2606	2028	1136-2531
			p ₁₋₂ = 0,010		p ₁₋₃ = 0,001	
Imax, о.е. × 10 ³	5,68	2,55-14,06	42,07	10,07-76,31	13,47	2,23-31,85
			p ₁₋₂ = 0,002		p ₂₋₃ = 0,043	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	2,28	0,96-5,85	2,20	1,34-7,84	1,81	0,17-4,34
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	2064	1676-2722	2020	1401-2186	2172	1008-2550
Imax, о.е. × 10 ³	12,87	7,83-27,64	25,91	17,10-47,40	22,98	9,13-35,90
			p ₁₋₂ = 0,031		p ₁₋₃ = 0,026	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	4,53	2,52-8,22	2,49	1,41-4,44	2,80	1,20-6,28
			p ₁₋₂ = 0,048		p ₁₋₃ = 0,049	
Синд./ Спонт.	2,04	1,20-3,60	1,04	0,34-1,77	1,78	1,20-6,28
			p ₁₋₂ = 0,031		p ₂₋₃ = 0,041	
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1003	609-1574	1097	863-1168	1138	895-1373
Imax, о.е. × 10 ³	8,68	3,81-23,08	26,71	12,38-37,48	31,92	18,17-46,61
			p ₁₋₂ = 0,015		p ₁₋₃ < 0,001 p ₂₋₃ = 0,049	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	2,70	1,13-7,55	2,45	0,56-3,29	3,41	1,94-7,00
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1117	805-1489	1052	955-1348	1009	708-1377
Imax, о.е. × 10 ³	17,93	7,02-36,56	34,56	18,45-76,75	66,78	47,07-107,81
			p ₁₋₂ = 0,007		p ₁₋₃ < 0,001	
S, о.е. × сек. × 10 ⁵	5,74	1,97-11,20	6,76	1,60-9,10	8,60	4,10-11,30
					p ₁₋₃ = 0,029	
Синд./ Спонт.	1,72	1,33-2,53	2,75	1,63-5,34	2,24	1,50-3,43
			p ₁₋₂ = 0,026		p ₁₋₃ = 0,043	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

С помощью корреляционного анализа исследованы особенности взаимосвязи между хемилюминесцентными показателями нейтрофилов и уровнями концентрации цитокинов в сыворотке крови. Обнаружено, что у лиц контрольной группы концентрация $IFN\gamma$ отрицательно взаимосвязана с максимумом интенсивности люминол-зависимой спонтанной ($r = -0,85$; $p = 0,014$) и площадью под кривой зимозан-индуцированной хемилюминесценции ($r = -0,96$; $p < 0,001$). У больных РГП с отсутствием в послеоперационном периоде сепсиса концентрация $IFN\gamma$ положительно коррелирует с максимумом интенсивности спонтанной ($r = 0,78$; $p = 0,013$) и индуцированной ($r = 0,75$; $p = 0,020$) люминол-зависимой хемилюминесценции, а также отрицательно — с временем выхода на максимум индуцированной ($r = -0,72$; $p = 0,030$) и индексом активации ($r = -0,80$; $p = 0,010$) люминол-зависимой хемилюминесценции. У больных РГП, у которых в послеоперационном периоде разовьется абдоминальный сепсис, концентрация $TNF\alpha$ отрицательно взаимосвязана с максимумом люминол-зависимой зимозан-индуцированной хемилюминесценции ($r = -0,52$; $p = 0,020$), а концентрация $IL-6$ также отрицательно с площадью под кривой данной хемилюминесцентной реакции ($r = -0,61$; $p = 0,008$).

Обсуждение

Течение и исход перитонита во многом определяется эффективностью воспалительных процессов и изменениями функциональной активности нейтрофилов как основной популяцией клеток, принимающих участие в процессах воспаления. Респираторный взрыв является важным защитным механизмом, лежащим в основе реактивности данной популяции клеток [4, 7, 8]. Установлено, что у больных РГП, послеоперационный период которых будет протекать без осложнений, уровень спонтанного синтеза первичных АФК нейтрофилами крови выше, чем у здоровых людей и больных с сепсисом. Реакция НАДФН-оксидазы на индукцию респираторного взрыва зимозаном при РГП незначительна, однако при отсутствии развития осложнений основного заболевания выявляется снижение индекса активации. Уровень спонтанного синтеза вторичных АФК нейтрофилами крови у больных без сепсиса в послеоперационном периоде выше, чем у здоровых лиц, но ниже, чем у больных с сепсисом. Индукция синтеза вторичных АФК под воздействием зимозана более выражена у пациентов с РГП, у которых

послеоперационный период будет осложнен сепсисом. При этом необходимо отметить, что бактерицидная активность нейтрофилов в большей степени определяется синтезом первичных АФК [4, 8, 12].

Уровни концентрации исследуемых цитокинов в сыворотке крови больных РГП отражают высокую активность иммунновоспалительного процесса. Вместе с тем содержание $IFN\gamma$ у больных с послеоперационным абдоминальным сепсисом в 1,9 раза выше, чем у пациентов, у которых послеоперационный период будет протекать без осложнений. Известно, что $IFN\gamma$ ингибирует развитие нейтрофильных гранулоцитов в динамике воспалительной реакции [9]. Соответственно, исходя из выявленных взаимосвязей между уровнями концентраций цитокинов и показателей респираторного взрыва нейтрофилов, можно заключить, что у здоровых людей при увеличении концентрации $IFN\gamma$ ингибирует спонтанный и индуцированный синтез вторичных АФК. У больных РГП, у которых не будет осложнений в послеоперационном периоде, сохраняется доминирование регуляции $IFN\gamma$ активности респираторного взрыва нейтрофилов. Однако, в отличие от здоровых людей, у лиц данной группы $IFN\gamma$ стимулирует спонтанный и индуцированный синтез вторичных АФК нейтрофилами крови, при ускорении выхода на максимум зимозан-индуцированной хемилюминесценции и ингибировании индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции. У больных, послеоперационный период которых осложнится абдоминальным сепсисом, активность дыхательного взрыва нейтрофилов регулируется $TNF\alpha$ и $IL-6$. Оба цитокина являются провоспалительными, стимулируют миграцию и функциональную активность фагоцитирующих клеток [1]. Тем не менее, у больных данной группы регуляторное влияние $TNF\alpha$ и $IL-6$ на нейтрофилы крови реализуется в ингибировании индуцированного синтеза вторичных АФК. Можно предположить, что стимулирующее влияние $IFN\gamma$ и ингибирующее воздействие $TNF\alpha$ и $IL-6$ на респираторный взрыв нейтрофилов крови у больных РГП связано с выбросом большого количества цитокинов в динамике острого иммунновоспалительного процесса и миграцией активированных клеток в очаг воспаления. При этом именно изменение самих цитокинов, регулирующих респираторный взрыв нейтрофилов, и является важным фактором, прогнозирующим развитие сепсиса при РГП.

Таким образом, у больных РГП на фоне повышения уровней провоспалительных цитокинов и $IFN\gamma$ в сыворотке увеличивается интенсивность респираторного взрыва нейтрофилов крови за счет активации синтеза как первичных, так и вторичных АФК. У больных РГП, у которых в динамике послеоперационного периода развивается абдоминальный сепсис, хемилюминесцентная активность нейтрофилов крови характеризуется пониженным уровнем спонтанного синтеза первичных АФК и повышенным уровнем спонтан-

ного синтеза вторичных АФК. Уровни синтеза первичных и вторичных АФК нейтрофилами при индукции респираторного взрыва зимозаном незначительно различаются в группах больных РГП в зависимости от последующего развития сепсиса в послеоперационном периоде. Важным в прогнозе развития абдоминального сепсиса у больных РГП является значительное увеличение концентрации $IFN\gamma$ в сыворотке крови и регуляторная зависимость респираторного взрыва нейтрофилов от $TNF\alpha$ и IL-6 в дооперационном периоде.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
2. Савельев В.С., Филимонов М.И., Гельфанд Б.Р., Подачин П.В., Бурневич С.З., Гиткович В.Е., Гайнулин Ш.М. Программируемый перитонеальный лаваж в лечении распространенного перитонита // Анналы хирургии, 1996. № 3. С. 25-29. [Savelyev V.S., Filimonov M.I., Gelfand B.R., Podachin P.V., Burnevich S.Z., Gitkovich V.E., Gaynulin Sh.M. Programmable peritoneal lavage in the treatment of widespread peritonitis. *Annaly khirurgii = Annals of Surgery*, 1996, no. 3, pp. 25-29. (In Russ.)]
3. Савченко А.А., Здзитовецкий А.Г., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная и энзиматическая активность нейтрофильных гранулоцитов у больных распространенным гнойным перитонитом в зависимости от исхода заболевания // Вестник РАМН, 2014. № 5-6. С. 23-28. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Chemiluminescent and enzyme activity of neutrophils in patients with widespread purulent peritonitis depending on the outcome of disease. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2014, no. 5-6, pp. 23-28. (In Russ.)]
4. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г. Иммунометаболические нарушения при распространенном гнойном перитоните. Новосибирск: Наука, 2013. 142 с. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G. Immune and Metabolic Disorders by the Widespread Purulent Peritonitis]. Novosibirsk: Science, 2013. 142 p.
5. Савченко А.А., Здзитовецкий Д.Э., Борисов А.Г., Лузан Н.А. Хемилюминесцентная активность нейтрофильных гранулоцитов и уровни концентрации цитокинов у больных распространенным гнойным перитонитом // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 1-2. С. 115-119. [Savchenko A.A., Zdzitovetskiy D.E., Borisov A.G., Luzan N.A. Neutrophil chemiluminescent activity and cytokine concentration levels in patients with extensive purulent peritonitis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 1-2, pp. 115-119. (In Russ.)]
6. Bone R.S., Balk R.A.B., Cerra F.B. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992, Vol. 20, no. 6, pp. 864-874.
7. Braga P.C., Lattuada N., Greco V., Sibilia V., Falchi M., Bianchi T., Dal Sasso M. Diclofenac-Choline Antioxidant Activity Investigated by means of Luminol Amplified Chemiluminescence of Human Neutrophil Bursts and Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy. *Drug Res. (Stuttg.)*, 2015, Vol. 65, no. 5, pp. 244-251.
8. Chen X.H., Deng Y.C., Zhong B.Y., Hao F. Aspergillus fumigatus diffusates suppress polymorphonuclear neutrophil phagocytic functions and respiratory burst levels in hematopoietic stem cell transplantation patients. *Genet. Mol. Res.*, 2015, Vol. 14, no. 3, pp. 9233-9243.
9. De Bruin A.M., Libregts S.F., Valkhof M., Boon L., Touw I.P., Nolte M.A. $IFN\gamma$ induces monopoiesis and inhibits neutrophil development during inflammation. *Blood*, 2012, Vol. 119, no. 6, pp. 153-155.
10. Hajishengallis G., Chavakis T., Hajishengallis E., Lambris J.D. Neutrophil homeostasis and inflammation: novel paradigms from studying periodontitis. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 98, no. 4, pp. 539-548.
11. Kolaczowska E., Kubes P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 159-175.
12. Kovács I., Horváth M., Kovács T., Somogyi K., Tretter L., Geiszt M., Petheő G.L. Comparison of proton channel, phagocyte oxidase, and respiratory burst levels between human eosinophil and neutrophil granulocytes. *Free Radic. Res.*, 2014, Vol. 48, no. 10, pp. 1190-1199.

13. Kuribayashi F., Tsuruta S., Yamazaki T., Nunoi H., Imajoh-Ohmi S., Kanegasaki S., Nakamura M. Cell adhesion markedly increases lucigenin-enhanced chemiluminescence of the phagocyte NADPH oxidase. *Genes Cells*, 2008, Vol. 13, no. 12, pp. 1249-1256.
14. Pliyev B.K. Anti-adhesive proteins and resolution of neutrophil-mediated inflammation. *Immunobiology*, 2013, Vol. 218, no. 8, pp. 1085-1092.
15. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonça A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, Vol. 22, no. 7, pp. 707-710.

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

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

Здзитовецкий Д.Э. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой и клиникой хирургических болезней им. проф. Ю.М. Лубенского ГБОУ ВПО «Красноярский государственный медицинский университет им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Гвоздев И.И. — младший научный сотрудник лаборатории клеточно-молекулярной 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. Voyno-Yasenetsky State Medical University, 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. Voyno-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Zdzitovetsky D.E., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department and Clinic of Surgical Illnesses it. J.M. Lubinskogo, Krasnoyarsk State V.F. Voyno-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Поступила 10.03.2016
Отправлена на доработку 31.05.2016
Принята к печати 05.07.2016

Received 10.03.2016
Revision received 31.05.2016
Accepted 05.07.2016

ПРОДУКЦИЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И АЛЬФА-2-МАКРОГЛОБУЛИНА КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ БОЛЬНЫХ КОЛОРЕКТАЛЬНЫМ РАКОМ

**Зорина В.Н.¹, Промзелева Н.В.¹, Зорин Н.А.¹, Рябичева Т.Г.²,
Зорина Р.М.¹**

¹ ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

² Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

Резюме. Колоректальный рак является третьим по распространенности онкологическим заболеванием со сложностями в диагностике и послеоперационном прогнозировании. Установлено участие провоспалительных цитокинов в патогенезе, однако содержание регулирующего их синтез альфа-2-макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ) остается малоизученным.

Целью работы было сравнительное изучение содержания $\alpha 2$ -МГ и некоторых провоспалительных цитокинов в сыворотке и краткосрочных культурах клеток крови при колоректальном раке до и после хирургического удаления опухоли.

При исследовании сыворотки крови и супернатантов суточных культур клеток крови пациентов с верифицированным колоректальным раком (КРР) в стадиях pT2-3N0-1M0 и pT4N0-1M0 выявлен ряд отличий от показателей здоровых доноров контрольной группы. Содержание IL-6 и TNF α в крови больных КРР до операции было достоверно повышено ($29,9 \pm 5,4$ пкг/мл и $3,4 \pm 1,5$ пкг/мл против $1,0 \pm 0,3$ пкг/мл и 0 пкг/мл у здоровых соответственно), после операции снижалось на 40-60% без достоверных отличий от дооперационного периода. В супернатантах культур, стимулированных митогенами, был достоверно снижен уровень IFN γ до операции (273 ± 123 пкг/мл против 804 ± 154 пкг/мл) и повышен уровень IL-6 (14412 ± 2570 пкг/мл против 1970 ± 457 пкг/мл). Содержание $\alpha 2$ -МГ при КРР до операции составило $1,96 \pm 0,11$ г/л в крови, $0,0304 \pm 0,0047$ г/л в супернатантах при спонтанном синтезе и $0,0300 \pm 0,0052$ г/л при митоген-индуцированном, без достоверных отличий от показателей контрольной группы ($2,21 \pm 0,17$ г/л, $0,0328 \pm 0,0018$ г/л и $0,0314 \pm 0,0019$ г/л соответственно) и данных в послеоперационном периоде.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что оперативное лечение не приводит к нормализации секреции и уровней провоспалительных IL-6 и TNF α в крови. Они подтверждают предположения о том, что важное значение при КРР имеет не уровень $\alpha 2$ -МГ, остающийся практически неизменным, а функциональное состояние его молекул, неадекватно реагирующих на изменения содержания

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

В.Н. Зорина, Н.В. Промзелева, Н.А. Зорин, Т.Г. Рябичева, Р.М. Зорина «Продукция провоспалительных цитокинов и альфа-2-макроглобулина клетками периферической крови больных колоректальным раком» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 5. С. 483-488.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-483-488

© Зорина В.Н. и соавт., 2016

For citation:

V.N. Zorina, N.V. Promzeleva, N.A. Zorin, T.G. Ryabicheva, R.M. Zorina "Production of proinflammatory cytokines and alpha-2-macroglobulin by peripheral blood cells in the patients with colorectal cancer", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 5, pp. 483-488.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-483-488

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-483-488>

цитокинов. Прогрессирующее в послеоперационном периоде подавление митоген-индуцированной секреции $IFN\gamma$ обосновывает необходимость назначения $IFN\gamma$ и IL-2 после хирургического лечения КРР.

Ключевые слова: колоректальный рак, альфа-2-макроглобулин, IL-6, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, культура клеток, митоген, супернатант, сыворотка крови

PRODUCTION OF PROINFLAMMATORY CYTOKINES AND ALPHA-2-MACROGLOBULIN BY PERIPHERAL BLOOD CELLS IN THE PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER

Zorina V.N.^a, Promzeleva N.V.^a, Zorin N.A.^a, Ryabicheva T.G.^b,
Zorina R.M.^a

^a Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Russian Ministry of Health Care, Novokuznetsk, Russian Federation

^b Closed Joint Stock Company "Vector-Best", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

Abstract. Colorectal cancer (CRC) is the third most common cancer worldwide, being quite complicated, with respect to diagnostics and postoperative prognosis. Proinflammatory cytokines are shown to be involved into CRC pathogenesis. However, the changes in alpha-2-macroglobulin ($\alpha 2$ -MG), a known regulator of cytokine production, still remain unclear. The aim of this work was to compare contents and production of $\alpha 2$ -MG and several pro-inflammatory cytokines in blood serum and supernates from short-term blood cell cultures. The samples were taken from the patients with CRC at initial terms and after surgical removal of the tumor.

Studies of cytokines and $\alpha 2$ -MG concentrations in serum and supernates of 24-h blood cell cultures from the patients with verified CRC (stages T2-3N0-1M0 and T4N0-1M0) have shown some sufficient differences from healthy volunteers (control group). Pre-surgery IL-6 and $TNF\alpha$ contents in blood of CRC patients was significantly increased against healthy controls (respectively, 29.9 ± 5.4 and 3.4 ± 1.5 pg/mL) versus control group (1.0 ± 0.3 and 0 pg/mL, respectively). Following surgical treatment, the cytokine levels were decreased by 40-60% after the operation, however, without significant differences from initial values.

The supernates of blood cultures stimulated with polyclonal mitogens exhibited significant reduction of $IFN\gamma$ levels prior to surgery (273 ± 123 pg/ml versus 804 ± 154 pg/mL), and elevated IL-6 levels (14412 ± 2570 pg/mL versus 1970 ± 457 pg/mL). The mean $\alpha 2$ -MG concentrations before CRC surgery comprised 1.96 ± 0.11 g/L for blood serum, 0.0304 ± 0.0047 g/L, for non-stimulated blood cell cultures, and 0.0300 ± 0.0052 g/L in mitogen-induced cultures. These parameters did not significantly differ from control values (2.21 ± 0.17 g/L, 0.0328 ± 0.0018 g/L, and 0.0314 ± 0.0019 g/L, respectively). Similar results have been yielded with the samples obtained after surgical treatment of the CRC patients.

The obtained data indicate that surgical treatment of CRC does not lead to normalization of the serum levels and secretion of pro-inflammatory IL-6 and $TNF\alpha$ cytokines by the patients' blood cells. Marginal changes in $\alpha 2$ -MG levels in colorectal cancer seem to be not of such importance, as functional state of the molecules which may abnormally respond to changing cytokine contents. The revealed post-surgical suppression of mitogen-induced $IFN\gamma$ secretion makes it necessary to suggest administration of $IFN\gamma$ and IL-2 after surgical treatment of CRC.

Keywords: colorectal cancer, alpha-2-macroglobulin, IL-6, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, cell culture, mitogen, supernate, blood serum

Колоректальный рак (КРР) занимает третье место в структуре злокачественных новообразований. Триггерные механизмы патологии не установлены, помимо генетической предрасположенности, в числе факторов, повышающих риск, часто упоминается курение и ожирение [7]. Диагностика заболевания на ранних стадиях болезни и послеоперационный прогноз также крайне за-

труднены. Известно, что в патогенезе КРР значительную роль играют провоспалительные цитокины и гормоны, однако однозначного мнения о возможности их использования в диагностике и прогнозе нет. В частности, негативным прогностическим фактором при КРР является избыток хорионического гонадотропина человека (ХГЧ), провоцирующий гиперсекрецию $TNF\alpha$ и IL-6

клетками крови, а также синтез IL-8 и матриксных металлопротеиназ (ММП), способствующих инвазии [6], однако подобный дисбаланс наблюдается и при эндокринной патологии без злокачественной пролиферации. Выявляемое при КРР повышение концентрации IL-6 и IL-8 в плазме крови может быть последствием ожирения [5]. Опубликованы данные по негативному прогнозу КРР при высоком содержании IL-6 и TNF α в перитонеальной жидкости в послеоперационном периоде [8], однако высокая индивидуальная вариабельность цитокинового профиля во всех биожидкостях не позволяет рассматривать уровни цитокинов в качестве надежных маркеров. Более перспективной представляется оценка секреции цитокинов клетками: продемонстрирована более активная экспрессия TNF α и инсулиноподобного фактора роста первого типа (IGF-I) культурами адипоцитов от пациенток с КРР, а также ЛПС-индуцированная экспрессия генов IL-6, IL-10 и TNF α [5], но данный метод малоприменим в широкой клинической практике, вследствие сложности, длительности и достаточно высокой стоимости культивирования монокультур клеток. В этой связи перспективным представляется применение упрощенных коммерческих аналогов, позволяющих за короткое время оценить общие тенденции изменений функциональной активности смешанной культуры клеток периферической крови, включая спонтанный и индуцированный коктейлем митогенов синтез цитокинов. Установлено, что при КРР у клеток крови снижена митоген-индуцированная способность продуцировать IFN γ , IL-18, а у больных с наибольшей степенью тяжести опухолевой прогрессии — повышена продукция TNF α и IL-8 [3], однако синтез в послеоперационном периоде не изучался. Кроме того, желательно оценивать не только секрецию цитокинов, но и влияющих на их синтез иммуномодуляторов. В частности, при анализе содержания альфа-2-макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ) в цитозоле клеток при злокачественных новообразованиях и полипах в прямой кишке, отмечена супрессия $\alpha 2$ -МГ при злокачественной пролиферации и повышение $\alpha 2$ -МГ при наличии полипа. Авторы предполагают, что важное значение имеет дисбаланс ингибиторов протеиназ [2], что, действительно, немаловажно при активной секреции ММП, однако $\alpha 2$ -МГ является еще и активным транспортером цитокинов, модулирующим их синтез [1].

Целью данной работы было сравнительное изучение содержания $\alpha 2$ -МГ и некоторых провоспалительных цитокинов в сыворотке и краткосрочных культурах клеток крови при колоректальном раке до и после хирургического удаления опухоли.

Материалы и методы

В работе использовалась сыворотка крови 15 больных КРР, поступивших в экстренное хирургическое отделение городской больницы № 1 г. Новокузнецка с клиникой кишечной непроходимости. Среди них у 7 пациентов — pT2-3N0-1M0, у 8 — pT4N0-1M0 (средний возраст $68,3 \pm 2,7$). Распространенность опухолевого процесса оценивалась по УЗИ ОБП, СКТ ОГК и ОБП, ФКС и интраоперационным данным. При гистологическом исследовании установлена аденокарцинома различной степени дифференцировки. Всем пациентам выполнены радикальные операции. Послеоперационный период протекал без осложнений. Образцы крови были получены до и через 2 недели после операции. В качестве контроля использовалась кровь 26 здоровых доноров. У всех пациентов было получено информированное согласие на участие в исследовании.

Образцы крови брали из локтевой вены и немедленно использовали для получения сыворотки и культивирования клеток крови с использованием наборов «Цитокин-стимул-Бест» (Вектор-Бест, Россия). Согласно инструкции, 1 мл цельной крови вносили во флакон, содержащий 4 мл стерильной питательной среды, гентамицин (2,5 Е/мл) и гепарин (100 мкг/мл). Далее 1 мл разбавленной крови переносили во второй флакон, содержащий 2 мкг липополисахарида пневмококка и по 4 мкг фитогемагглютинаина-Р и конканавалина-А. Флаконы закрывали стерильными пробками и термостатировали 24 часа. Сыворотку крови и супернатанты культур клеток отделяли центрифугированием и использовали для исследования.

Для определения концентраций IL-6, IFN γ и TNF α использовали метод твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на основе наборов фирмы «Вектор-Бест» и комплекса аналитического оборудования для ELISA (Bio-Rad, США).

Концентрацию $\alpha 2$ -МГ в сыворотке крови оценивали методом низковольтного ракетного иммуноэлектрофореза, а в супернатантах культур клеток крови — методом ИФА, с использованием исследовательских тест-систем, разработанных на базе НИЛ иммунологии ГБОУ ДПО НГИУВ.

Статистическую обработку полученных данных проводили при помощи программы для биостатистики InStat-2 (GraphPad, США). Использовалось парное межгрупповое сравнение показателей методами параметрической либо непараметрической статистики, в зависимости от результатов проверки нормальности распределения признаков по критерию Колмогорова–Смирнова. В таблице 1 указаны значения $M \pm m$.

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ И α 2-МГ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУПЕРНАТАНТАХ СУТОЧНЫХ КУЛЬТУР КЛЕТОК КРОВИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Показатели	Уровень в образцах:	Контрольная группа (n = 26)	КРР до операции (n = 15)	КРР после операции (n = 15)
α 2-МГ (г/л)	сыворотка крови	2,21 $\pm$ 0,17	1,96 $\pm$ 0,11	1,8 $\pm$ 0,13
	супернатанты спонтанная секреция	0,0328 $\pm$ 0,002	0,0304 $\pm$ 0,005	0,0299 $\pm$ 0,006
	супернатанты митоген-индуцированная секреция	0,0314 $\pm$ 0,002	0,0300 $\pm$ 0,005	0,0288 $\pm$ 0,007
IL-6 (пкг/мл)	сыворотка крови	1,0 $\pm$ 0,3	29,9 $\pm$ 5,4*	17,9 $\pm$ 4,7*
	супернатанты спонтанная секреция	142 $\pm$ 44	134 $\pm$ 36	122 $\pm$ 63
	супернатанты митоген-индуцированная секреция	1970 $\pm$ 4566	14412 $\pm$ 2570*	11959 $\pm$ 1749*
TNF α (пкг/мл)	сыворотка крови	0	3,4 $\pm$ 1,5*	1,4 $\pm$ 1,1*
	супернатанты спонтанная секреция	2 $\pm$ 0,4	4 $\pm$ 2	2 $\pm$ 2
	супернатанты митоген-индуцированная секреция	1223 $\pm$ 332	3449 $\pm$ 765*	2049 $\pm$ 432*
IFN γ (пкг/мл)	сыворотка крови	0	0	0
	супернатанты спонтанная секреция	0	0	0
	супернатанты митоген-индуцированная секреция	804 $\pm$ 154	273 $\pm$ 123*	30 $\pm$ 11* **
IL-2 (пкг/мл)	сыворотка крови	0	0	0
	супернатанты спонтанная секреция	x	x	x
	супернатанты митоген-индуцированная секреция	x	x	x

Примечание. * – $p < 0,05$ по сравнению с контрольной группой, ** – $p < 0,05$ по сравнению с дооперационным периодом; x – показатель не изучался.

Результаты и обсуждение

В сыворотке крови больных КРР и здоровых контрольной группы IFN γ и IL-2 не обнаруживались методом ИФА (табл. 1). Содержание IL-6 и TNF α в крови больных КРР до операции было достоверно повышено по сравнению с контролем. В послеоперационном периоде уровни данных цитокинов имели тенденцию к снижению (в среднем на 40-60%, однако без достоверных различий между группами больных), по-прежнему статистически значимо превышая контрольные данные. При этом содержание модулирующего их синтез α 2-МГ демонстрировало тенденцию к снижению при КРР как до, так и после оперативного лечения (на 11-19%), без достоверных отличий от контроля. В целом это

согласуется с данными других авторов, отмечавших повышение содержания IL-6 и TNF α в крови больных КРР [6], а также снижение уровня α 2-МГ [2]. Необходимо отметить, что даже при отсутствии статистически достоверного снижения, недостаток α 2-МГ может неблагоприятно сказываться на течении КРР. Установлено, что при данном заболевании наблюдается значительное нарушение гликозилированности молекул α 2-МГ, они менее активно формируют комплексы с IGF-связывающим белком-2 (IGFBP-2) и цитокинами, возрастает количество окисленных и малоактивных молекул, что крайне негативно влияет на регуляторно-транспортные функции этого белка [9]. При этом даже избыток IL-6, стимулирующего синтез α 2-МГ [1] не способен

увеличить содержание $\alpha 2$ -МГ в крови более чем до 2 г/л. Можно предположить, что выявление пациентов не только со значительно повышенным в послеоперационном периоде содержанием провоспалительных цитокинов, но и с наиболее низкими концентрациями $\alpha 2$ -МГ позволит повысить точность прогнозирования рецидивов. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные исследования с привлечением большего количества больных, позволяющие выявить достоверные различия при относительно высокой вариабельности результатов.

При спонтанном синтезе суточными культурами клеток крови содержание IL-6 в супернатантах достоверно не изменялось при КРР и было в 4-6 раз выше сывороточного содержания. Однако содержание IL-6 в супернатантах и сыворотке здоровых различалось более чем в 100 раз. Уровень TNF α был сопоставим с сывороточным содержанием, а IFN γ также не обнаруживался. Содержание $\alpha 2$ -МГ в супернатантах было в 60-67 раз ниже, чем в сыворотке крови, выраженных различий в концентрациях между контролем и КРР не выявлено. Поскольку данный белок синтезируется преимущественно гепатоцитами (другие типы клеток синтезируют его в очень небольших количествах), используемое в методике количество $\alpha 2$ -МГ (в среднем 0,4 г/л в 5 мл среды, содержащей 1 мл крови) в супернатантах уменьшается за сутки почти в 13 раз. Предположительно, снижение происходит за счет активного поглощения клетками комплексов $\alpha 2$ -МГ с цитокинами и протеиназами через рецепторы эндоцитоза [1]. При этом важное значение имеет не сходная активность поглощения в норме и при патологии, а функциональное состояние молекул $\alpha 2$ -МГ при КРР: известно, что при КРР обнаруживается много дефектных и окисленных форм $\alpha 2$ -МГ со сниженной активностью [9].

При митогенной стимуляции, анализ способности клеток крови к секреции IL-6 выявил обратное по сравнению со спонтанным синтезом явление — у больных КРР секреция данного цитокина значительно возросла, превышая показатели клеточной активности в контрольной группе в 6-7 раз. В послеоперационном периоде наблюдалась тенденция к снижению активности секреции (на 17%). Аналогично изменялась активность секреции TNF α при стимуляции — почти трехкратное достоверное превышение контрольных показателей до операции с достоверной тенденцией к снижению в послеоперационном периоде. Таким образом, результаты определения митоген-индуцированной секреции TNF α и IL-6 в суточных культурах в целом

совпадают по направленности с результатами анализа в стимулированных ЛПС монокультурах адипоцитов при КРР [5] и имеют некоторую перспективу в качестве дополнительного прогностического критерия. Продукция IFN γ клетками крови под влиянием поликлональных митогенов у больных КРР была существенно ниже в сравнении с контролем: почти в 3 раза ниже до удаления опухоли и в 27 раз ниже у пациентов после радикальной операции. Это совпадает с результатами проведенного ранее исследования, отмечавшего значительное снижение активности стимулированной продукции IFN γ и IL-2 у всех больных, при повышении TNF α в особо тяжелых случаях [3]. При этом синтез IL-10, способного активно подавлять синтез IFN γ и IL-2 [4], остается неизменным [3]. Следовательно, причиной данного дисбаланса может быть либо активная секреция факторов роста при онкологических заболеваниях, включая подавляющий синтез IFN γ и IL-2 фактор роста TGF- β [4], либо повреждение целостности молекул $\alpha 2$ -МГ, с изменением функциональной активности, в том числе транспорта цитокинов и модуляции их синтеза [1]. Учитывая выявленную супрессию продукции IFN γ стимулированными клетками крови в до- и особенно в послеоперационном периоде, подтверждающую установленное ранее подавление продукции IFN γ и IL-2 у больных аденокарциномой толстой кишки [3], можно предположить, что дополнительное назначение в послеоперационном периоде антиоксидантов для сохранения функциональной активности молекул $\alpha 2$ -МГ, а также генно-инженерных аналогов IL-2 (Ронколейкин) или IFN γ , может способствовать улучшению прогноза КРР.

Выводы

1. В крови больных КРР до оперативного вмешательства значительно повышено содержание IL-6 и TNF α на фоне недостоверного снижения модулирующего их синтез $\alpha 2$ -МГ, оперативное лечение не приводит к полной нормализации показателей.

2. В супернатантах суточных культур клеток крови больных КРР и здоровых доноров активность спонтанной секреции IL-6, TNF α , IFN γ и $\alpha 2$ -МГ не различается.

3. Митоген-индуцированная секреция IL-6 и TNF α суточными культурами клеток крови при КРР значительно повышена, а IFN γ — снижена в дооперационном периоде, при этом уровни IL-6 и TNF α в супернатантах после операции имеют недостоверную тенденцию к снижению, а IFN γ достоверно снижается.

Список литературы / References

1. Зорин Н.А., Зорина В.Н., Зорина Р.М. Роль белков семейства макроглобулинов в регуляции опухолевого роста (Обзор литературы) // Онтогенез, 2006. Т. 37, № 1. С. 12-19. [Zorin N.A., Zorina V.N., Zorina R.M. Role of proteins of the macroglobulin family in regulation of tumor growth. *Ontogenez = Ontogenesis*, 2006, Vol. 37, no. 1, pp. 12-19. (In Russ.)]
2. Кит О.И., Франциянц Е.М., Козлова Л.С., Терпугов А.Л. Серпины в гиперпластических тканях толстой кишки // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология, 2014. № 10. С. 18-21. [Kit O.I., Frantsiianets E.M., Kozlova L.S., Terpugov A.L. Serpins in hyperplastic colon tissue. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya = Experimental and Clinical Gastroenterology*, 2014, no.10, pp.18-21. (In Russ.)]
3. Соснина А.В., Аутеншлюс А.И., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Рукавишников М.Ю., Михайлова Е.С. Морозов Д.В., Фурсов С.А., Агарина Н.В. Цитокинпродуцирующая функция клеток периферической крови у больных колоректальным раком // Медицинская иммунология, 2011. Т. 13, № 2-3. С. 197-204. [Sosnina A.V., Aytenshlyus A.I., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Rukhovichnikov M.Yu., Mikhailova E.S., Fursov S.A., Agarina N.V. Cytokine-producing function of peripheral blood cells in colorectal cancer patients. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2011, Vol. 13, no. 2-3, pp. 197-204. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2011-2-3-197-204>
4. Фрейдлин И.С. Паракринная и аутокринные механизмы цитокиновой иммунорегуляции // Иммунология, 2001. № 5. С. 4-7. [Freidlin I.S. Paracrine and autocrine mechanisms of cytokine immunoregulation. *Immunologiya = Immunology*, 2001, no. 5, pp. 4-7. (In Russ.)]
5. Amor S., Iglesias-de la Cruz M.C., Ferrero E., García-Villar O., Barrios V., Fernandez N., Monge L., García-Villalón A.L., Granado M. Peritumoral adipose tissue as a source of inflammatory and angiogenic factors in colorectal cancer. *Int. J. Colorectal Dis.*, 2016, Vol. 31, no. 2, pp. 365-375.
6. Khare P., Bose A., Singh P., Singh S., Javed S., Jain S.K., Singh O., Pal R. Gonadotropin and tumorigenesis: Direct and indirect effects on inflammatory and immunosuppressive mediators and invasion. *Mol. Carcinog.*, 2016 [Epub ahead of print].
7. Pietrzyk L., Torres A., Maciejewski R., Torres K. Obesity and Obese-related Chronic Low-grade Inflammation in Promotion of Colorectal Cancer Development. *Asian Pac. J. Cancer Prev.*, 2015, Vol. 16, no. 10, pp. 4161-4168.
8. Sparreboom C.L., Wu Z., Dereci A., Boersema G.S., Menon A.G., Ji J., Kleinrensink G.J., Lange J.F. Cytokines as Early Markers of Colorectal Anastomotic Leakage: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Gastroenterol. Res. Pract.*, 2016, 3786418.
9. Šunderić M., Đukanović B., Malenković V., Nedić O. Molecular forms of the insulin-like growth factor-binding protein-2 in patients with colorectal cancer. *Exp. Mol. Pathol.*, 2014, Vol. 96, no. 1, pp. 48-53.

Авторы:

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

Промзелева Н.В. — к.м.н., доцент кафедры терапии ГБОУ ДПО «Новокузнецкий государственный институт усовершенствования врачей» Министерства здравоохранения РФ, г. Новокузнецк, Россия

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

Рябичева Т.Г. — ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов, Закрытое акционерное общество «Вектор-Бест», п. Кольцово, Новосибирская обл., Россия

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

Authors:

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

Promzeleva N.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Therapy, Novokuznetsk State Institute of Postgraduate Medicine, Novokuznetsk, Russian Federation

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

Ryabicheva T.G., Leading Research Associate, Cytokine Laboratory, Closed Joint Stock Company "Vector-Best", Kol'tsovo, Novosibirsk Region, Russian Federation

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

Поступила 28.06.2016
Принята к печати 05.07.2016

Received 28.06.2016
Accepted 05.07.2016

ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛИ-АЛЬФА У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ЛИМФОЛЕЙКОЗОМ

Зотина Е.Н.¹, Загоскина Т.П.², Шардаков В.И.¹, Йовдий А.В.¹,
Зайцева Г.А.¹

¹ ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

² ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Киров, Россия

Резюме. Изучено прогностическое значение провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли-альфа (TNF α) у 140 больных с впервые выявленным хроническим лимфолейкозом (ХЛЛ). Содержание TNF α в сыворотке крови определяли твердофазным иммуноферментным методом. Установлено, что у пациентов с впервые выявленным ХЛЛ наблюдается достоверное увеличение содержания TNF α в сыворотке крови по сравнению со здоровыми лицами. Выявлена зависимость концентраций данного цитокина от стадии и варианта течения заболевания: наиболее высокие уровни TNF α в сыворотке крови отмечались у больных с продвинутыми стадиями заболевания и с прогрессирующим течением ХЛЛ. Установлены корреляционные связи между изучаемым цитокином и клинико-лабораторными параметрами, отражающими пролиферативную активность и размер опухолевого клона. Проведение иммунохимиотерапии сопровождалось достоверным снижением уровня TNF α . По данным многофакторного регрессионного анализа, уровень TNF α в момент постановки диагноза является независимым предиктором общей выживаемости. Следовательно, TNF α играет важную роль в механизмах патогенеза ХЛЛ и может использоваться в качестве дополнительного фактора прогноза ХЛЛ.

Ключевые слова: хронический лимфолейкоз, цитокины, фактор некроза опухоли-альфа, прогноз, общая выживаемость

PROGNOSTIC VALUE OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA IN PATIENTS WITH CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA

Zotina E.N.^a, Zagoskina T.P.^b, Shardakov V.I.^a, Yovdy A.V.^a,
Zaitseva G.A.^a

^a Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

^b Kirov State Medical Academy, Kirov, Russian Federation

Abstract. The prognostic value of tumor necrosis factor-alfa (TNF α), a pro-inflammatory cytokine was studied in 140 patients with a newly diagnosed chronic lymphocytic leukemia (CLL). TNF α contents in blood

Адрес для переписки:

Зотина Екатерина Николаевна
ФГБУН «Кировский научно-исследовательский
институт гематологии и переливания крови
Федерального медико-биологического агентства»
610027, Россия, г. Киров, ул. Красноармейская, 72.
Тел.: 8 (8332) 37-11-97.
Факс: 8 (8332) 54-97-31.
E-mail: enzotina@mail.ru

Address for correspondence:

Zotina Ekaterina N.
Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion
610027, Russian Federation, Kirov, Krasnoarmeyskaya str., 72.
Phone: 7 (8332) 37-11-97.
Fax.: 7 (8332) 54-97-31.
E-mail: enzotina@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Н. Зотина, Т.П. Загоскина, В.И. Шардаков,
А.В. Йовдий, Г.А. Зайцева «Прогностическое значение
фактора некроза опухоли-альфа у больных хроническим
лимфолейкозом» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18,
№ 5. С. 489-494. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-495-497

© Зотина Е.Н. и соавт., 2016

For citation:

E.N. Zotina, T.P. Zagoskina, V.I. Shardakov, A.V. Yovdy,
G.A. Zaitseva "Prognostic value of tumor necrosis factor-alpha in
patients with chronic lymphocytic leukemia", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 5,
pp. 489-494. doi: 10.15789/1563-0625-2016-5-495-497

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-5-495-497>

serum was determined using ELISA method. A significant increase of serum TNF α was shown in patients with newly diagnosed CLL, as compared to healthy individuals. Dependence of the cytokine concentration on clinical stage and course of disease was revealed: the highest levels of serum TNF α were registered in patients with advanced disease and/or CLL progression. Distinct correlations were revealed between the studied cytokine amounts and clinical laboratory parameters reflecting the cell proliferative activity and tumor clone size. Immunochemotherapy was accompanied by a significant reduction of TNF α levels. According to the data from multivariate regression analysis. TNF α level of at the time of the diagnosis was an independent predictor of overall survival. Hence, TNF α plays an important role in CLL pathogenesis and may be used as an additional predictive factor for CLL outcomes.

Keywords: chronic lymphocytic leukemia, cytokines, tumor necrosis factor- α , prognosis, overall survival

Введение

Хронический лимфолейкоз (ХЛЛ) — наиболее распространенное лимфопролиферативное заболевание, характеризующееся повышенной пролиферацией и накоплением клональных лимфоцитов, имеющих морфологию зрелых лимфоидных элементов и иммунофенотип, соответствующий В-клеткам поздних стадий дифференцировки. Характерным признаком ХЛЛ является накопление трансформированных В-лимфоцитов в костном мозге, периферической крови и других органах [3, 8]. При этом опухолевые лимфоциты функционально малоактивны и не способны к полноценному иммунному ответу. Поэтому ХЛЛ относят к опухолям иммунной системы.

Согласно современным представлениям, в основе развития ХЛЛ лежит нарушение взаимодействия опухолевых клеток и иммунной системы, которое сопровождается дисбалансом продукции цитокинов и их регуляции, что оказывает влияние на течение неопластического процесса [1, 8]. Цитокины — это большая группа биологически активных веществ белковой, пептидной или гликопротеиновой природы, которые продуцируются клетками кроветворной системы и являются сигнальными молекулами, взаимодействующими с мембранными рецепторами и модулирующими выживаемость, рост, дифференцировку, миграцию, функциональную активность и апоптоз клеток [2].

В настоящее время большое внимание в расшифровке патогенеза ХЛЛ уделяется изучению роли провоспалительного цитокина — фактора некроза опухоли-альфа (TNF α), который характеризуется антиканцерогенными свойствами. Основными продуцентами TNF α являются моноциты, макрофаги и лимфоциты [2, 4]. Установлено, что TNF α обладает избирательной цитотоксичностью в отношении злокачественных клеток за счет индукции образования и освобождения свободных радикалов, а также ухудшения трофики, васкуляризации и оксигенации опухоли в связи с нарушением коагуляционно-

го гемостаза и реологических свойств крови [1, 2, 6]. Наряду с этим было показано, что TNF α участвует практически во всех стадиях канцерогенеза и способствует прогрессии опухолевого клона. В соответствии с данными литературы, не исключают роль TNF α в механизмах развития аутокринной и паракринной стимуляции клеток ХЛЛ [4]. Помимо прямого влияния на формирование опухолевой ткани через активацию факторов транскрипции, TNF α также влияет на рост сосудов и экспрессию адгезионных молекул, вовлеченных в метастазирование трансформированных клеток [1, 5, 8].

К сожалению, в настоящее время имеются лишь единичные работы, посвященные исследованию данного цитокина при ХЛЛ [1, 5, 6, 9]. Исследования носят фрагментарный характер и охватывают небольшую выборку пациентов. Недостаточно освещенными остаются вопросы, касающиеся определения взаимосвязей TNF α с другими факторами неблагоприятного прогноза течения ХЛЛ, не описана динамика данного цитокина в ходе опухолевой прогрессии. В связи с этим определение характера и механизмов нарушения продукции TNF α у больных ХЛЛ в развитии опухолевого процесса представляется актуальным.

Целью настоящего исследования явились оценка уровня TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ и установление связи данного показателя с вариантом течения заболевания и прогнозом.

Материалы и методы

В исследование включено 140 больных с впервые выявленным ХЛЛ в возрасте от 38 до 75 лет. Медиана возраста составила 58 лет. Среди обследованных было 81 (58%) мужчин и 59 (42%) женщин. У 52 (37%) больных зарегистрирована стадия А, у 69 (49%) — стадия В и у 19 (14%) — стадия С по классификации J. Binet. Соматический статус пациентов по шкале ECOG на момент постановки диагноза варьировал от 0 до 2 баллов: 0 баллов имели 43 (31%), 1 балл — 80 (57%) и

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХЛЛ

Параметр	Количество больных, абс. (%)
Общее количество больных	140 (100)
Медиана возраста, лет (диапазон)	58 (38-75)
Пол: мужской женский	81 (58) 59 (42)
Стадия по J. Binet: А В С	52 (37) 69 (49) 19 (14)
Соматический статус по шкале ECOG: 0 баллов 1 балл 2 балла	88 (63) 43 (31) 9 (6)
Вариант течения: прогрессирующий индолентный	78 (56) 62 (44)

2 балла — 17 (12%) больных. Характеристика пациентов представлена в таблице 1.

Диагноз ХЛЛ верифицировали согласно общепринятым критериям [7], включавшим данные клинического анализа крови, иммунофенотипирования лимфоидных элементов периферической крови и/или костного мозга с помощью проточной цитофлуориметрии, а также исследование пунктата костного мозга с подсчетом миелограммы и/или гистологическое исследование трепанобиоптата.

В ходе наблюдения за пациентами отмечались различные темпы прогрессирования заболевания. В зависимости от варианта течения ХЛЛ все обследованные были распределены на 2 группы. В первую группу вошли 78 (56%) больных, у которых выявлено индолентное течение опухолевого процесса, вторую группу составили 62 (44%) пациента с прогрессирующим течением ХЛЛ. Вялотекущее, медленно развивающееся течение заболевания констатировали спустя 2 года с момента постановки диагноза. У этих больных на протяжении 24 месяцев и более не наблюдалось нарастания лейкоцитоза, абсолютного лимфоцитоза. Лимфатические узлы, печень и селезенка оставались нормальных размеров. При прогрессирующем течении ХЛЛ удвоение числа лимфоцитов, увеличение размеров лимфатических узлов, селезенки и печени, развитие анемии и тромбоцитопении отмечалось в ближайшие 24 месяца от момента постановки диагноза.

Пациентам назначалась иммунохимиотерапия по программе «R-FC», которая включала: ритуксимаб 375 мг/м² внутривенно в первый курс химиотерапии и 500 мг/м² в последующие курсы

в первый день, циклофосфамид 250 мг/м² внутривенно во 2-4 дни курса, флударабин 25 мг/м² внутривенно или 40 мг/м² внутрь во 2-4 дни курса). Курсы RFC проводились каждые 4 недели до максимального эффекта, но не более 6.

Содержание TNFα в сыворотке крови определяли твердофазным иммуноферментным методом с использованием наборов ProCon, выпускаемых ООО «Протеиновый контур» (Санкт-Петербург), согласно прилагаемым инструкциям. Анализ проводился с образцами сыворотки крови больных, хранившихся при температуре -20 °С. Непосредственно перед анализом образцы размораживали посредством тепловой обработки в водяной бане при температуре 37 °С, чтобы предотвратить осаждение фибриногена. Количественный учет результатов реакции проводили с помощью автоматического фотометра для микропланшетов при длине волны 450 нм. Концентрацию TNFα рассчитывали путем построения калибровочных кривых зависимости оптической плотности от концентрации для стандартного антигена и по построенным графикам определяли концентрацию цитокинов в пикограммах на миллилитр (пг/мл) в исследуемых образцах. У всех пациентов концентрацию TNFα определяли в момент постановки диагноза до начала противоопухолевого лечения и после его завершения. В качестве контрольной группы обследовано 50 первичных доноров крови без соматической и инфекционной патологии.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с помощью статистической прикладной программы STATISTICA 8. Количественные признаки с нормальным распределением

ем представлены как $M \pm \delta$ (среднее $\pm$ стандартное отклонение). Для выявления существенных различий по количественным признакам использовали критерий Стьюдента. Для оценки корреляционных связей использовали ранговый коэффициент корреляции R Спирмена для количественных значений. Оценку прогностической ценности признаков в отношении общей выживаемости больных ХЛЛ проводили с помощью регрессионной модели пропорционального риска Кокса. Различия показателей считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При анализе уровня TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ в момент постановки диагноза выявлено достоверное увеличение данного показателя в 2,5 раза ($12,2 \pm 5,41$ пг/мл) по сравнению со здоровыми лицами — $4,6 \pm 1,37$ пг/мл ($p < 0,001$), что, по-видимому, связано с высокой пролиферативной активностью клеток и быстрым увеличением опухолевого субстрата.

Установлено, что содержание TNF α в сыворотке крови зависело от стадии ХЛЛ. Так, у пациентов со стадиями В и С по классификации J. Binet наблюдался более высокий уровень TNF α в сыворотке крови по сравнению с больными, имевшими стадию А, и равнялся $20,7 \pm 7,84$ пг/мл и $8,4 \pm 3,71$ пг/мл соответственно ($p < 0,001$). Высокий уровень TNF α в сыворотке крови у пациентов с продвинутыми стадиями, вероятнее всего, можно объяснить усилением процессов опухолевой пролиферации, так как, по мнению ряда исследователей, изучаемый цитокин может стимулировать рост и продолжительность выживаемости опухолевых клеток [4, 9]. Следует также отметить способность самих опухолевых клеток при лимфопролиферативных заболеваниях вырабатывать широкий спектр цитокинов, являющихся для них факторами роста и метастазирования [1, 4, 6].

По мере прогрессирования опухолевого процесса отмечалось увеличение содержания TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ. Так, у больных с индолентным течением заболевания концентрация изучаемого цитокина была достоверно ниже, чем у лиц с прогрессирующим течением ХЛЛ ($25,8 \pm 8,67$ пг/мл и $9,6 \pm 1,45$ пг/мл соответственно; $p < 0,001$), что косвенным образом может указывать на связь уровня TNF α с размером опухолевой массы. Прогрессирующее течение ХЛЛ характеризовалось наличием большой опухолевой массы и высоким содержанием TNF α . В то же время индолентному течению заболевания было свойственно менее выраженное по-

вышение уровня TNF α и были менее выражены такие признаки заболевания, как абсолютный лимфоцитоз, органомегалия и лимфаденопатия.

При проведении корреляционного анализа установлены сильные положительные корреляционные связи между концентрацией TNF α и такими показателями, как абсолютное число лимфоцитов в периферической крови ($r = 0,85$; $p < 0,001$), уровень тимидинкиназы (ТК) в сыворотке крови ($r = 0,93$; $p < 0,001$). Корреляция между содержанием TNF α и количеством CD95⁺ лимфоцитов, несущих основной маркер апоптоза, была менее выражена, являлась средней положительной ($r = 0,56$; $p = 0,007$). Выявлена сильная отрицательная корреляционная связь между уровнем TNF α и содержанием гемоглобина ($r = -0,81$; $p < 0,001$), тромбоцитов ($r = -0,80$; $p < 0,001$). В то же время содержание TNF α не коррелировало с возрастом ($r = 0,23$; $p > 0,05$) и полом пациентов ($r = 0,20$; $p > 0,05$).

Проведение химиотерапии у больных ХЛЛ сопровождалось достоверным снижением уровня TNF α в 1,8 раза по сравнению с пациентами до начала лечения ($12,2 \pm 5,41$ пг/мл и $6,7 \pm 1,14$ пг/мл, $p = 0,013$), что указывает на уменьшение размеров опухоли и выраженности интоксикационного синдрома. Следует отметить, что после завершения химиотерапии у большинства пациентов полной нормализации изучаемого цитокина не произошло, что, вероятнее всего, связано с токсическим воздействием применяемых противоопухолевых препаратов на различные органы и ткани [3].

Для оценки влияния TNF α на продолжительность общей выживаемости (ОВ) больных ХЛЛ были проведены однофакторный и многофакторный анализы. С помощью однофакторного регрессионного анализа были определены факторы, имеющие неблагоприятное прогностическое значение. Результаты однофакторного анализа показали, что у пациентов с ХЛЛ факторами, статистически достоверно влияющими на ОВ, являются возраст ($p = 0,033$), пол ($p = 0,021$), стадия заболевания ($p = 0,007$), соматический статус по шкале ECOG ($p = 0,019$), время удвоения лимфоцитов ($p = 0,023$), активность сывороточной ТК ($p = 0,009$), содержание в сыворотке крови TNF α ($p = 0,012$).

Наряду с этим, для исключения факторов, действующих односторонне и равнозначно, проведен многофакторный анализ. В многофакторном анализе на основе модели пропорциональных рисков Кокса использовали параметры, которые при проведении однофакторного анализа показали значимое влияние

ТАБЛИЦА 2. НЕБЛАГОПРИЯТНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ОБЩУЮ ВЫЖИВАЕМОСТЬ БОЛЬНЫХ ХЛЛ ПО ДАННЫМ МНОГОФАКТОРНОГО АНАЛИЗА

Параметры	Пороговое значение	Отношение рисков (95% ДИ)	p
Пол	мужской	1,47 (1,26-1,83)	0,027
Возраст	> 60 лет	0,83 (0,61-1,27)	> 0,05
Стадия	В и С	2,28 (2,13-3,10)	< 0,001
Соматический статус по ECOG	> 2 баллов	0,81 (0,62-1,13)	> 0,05
Время удвоения лимфоцитов	< 12 мес	1,76 (1,28-1,92)	0,014
Активность ТК	> 10 Ед/л	2,56 (2,23-2,91)	< 0,001
Содержание TNF α	> 13 пг/мл	1,63 (1,27-1,89)	0,013

Примечание. ДИ – доверительный интервал.

на ОВ. Полученные результаты представлены в таблице 2, из которых видно, что среди исследованных показателей независимое прогностическое значение в отношении ОВ больных ХЛЛ имеют пол, стадия заболевания, активность сывороточной ТК, а также содержание TNF α в сыворотке крови.

Наблюдаемые закономерности изменения уровня TNF α в сыворотке крови больных ХЛЛ на разных стадиях заболевания и в процессе иммунохимиотерапии расширяют представления о молекулярно-клеточных механизмах развития патогенеза данной опухоли.

Выводы

Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о повышении сывороточного уровня TNF α у больных с впервые

выявленным ХЛЛ по сравнению со здоровыми лицами. Обнаружена зависимость концентраций TNF α от стадии и варианта течения заболевания. Наиболее высокие уровни TNF α в сыворотке крови отмечались у пациентов с продвинутыми стадиями и с прогрессирующим течением ХЛЛ. Проведение иммунохимиотерапии у больных ХЛЛ сопровождалось достоверным снижением содержания TNF α . По данным многофакторного регрессионного анализа, уровень TNF α в момент постановки диагноза является независимым предиктором общей выживаемости, наряду с возрастом, стадией заболевания, временем удвоения лимфоцитов, активностью ТК. Следовательно, TNF α играет важную роль в механизмах патогенеза ХЛЛ и может использоваться в качестве дополнительного фактора прогноза течения ХЛЛ и эффективности лечения.

Список литературы / References

1. Жевак Т.Н., Чеснокова Н.П., Шелехова Т.В. Закономерности изменений цитокинового статуса при хроническом лимфолейкозе и их роль в патогенезе прогрессирующих форм заболевания // Саратовский научно-медицинский журнал, 2012. Т. 8, № 2. С. 203-209. [Zhevak T.N., Chesnokova N.P., Schelekhova T.V. Regularities of cytokine status changes in chronic lymphocytic leukaemia and their role in pathogenesis forms of disease. *Saratovskiy nauchno-meditsinskiy zhurnal = Saratov Journal of Medical Scientific Research*, 2012, Vol. 8, no 2, pp. 203-209. (In Russ.)]
2. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines]. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.
3. Волкова М.А. Клиническая онкогематология. М.: Медицина, 2007. 1120 с. [Volkova M.A. Clinical Oncohematology]. Moscow: Medicine, 2007. 1120 p.
4. Balkwill F., Joffroy C. TNF: a tumor-suppressing factor or tumor-promoting factor? *Future Oncology*, 2010, Vol. 6, no. 12, pp. 1833-1836.
5. Bojarska-Junak A., Hus I., Szczepanek E.W., Dmoszynska A., Rolinski J. Peripheral blood and bone marrow TNF and TNF receptors in early and advanced stages of B-CLL in correlation with ZAP-70 protein and CD38 antigen. *Leukemia Research*, 2008, Vol. 32, no 2, pp. 225-233.
6. Ferrajoli A., Keating M.J., Manshouri T., Giles F.J., Dey A., Estrov Z., Koller C.A., Kurzrock R., Thomas D.A., Faderl S., Lerner S., O'Brien S., Albitar M. The clinical significance of tumor necrosis factor- α plasma level in patients having chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 2002, Vol. 100, no. 4, pp. 1215-1219.

7. Hallek M., Cheson B.D., Catovsky D., Caligaris F., Dighiero G., Dohner H., Hillmen P., Keating M.J., Montserrat E., Rai K.R., Kipps T.J., International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood*, 2008, Vol. 111, no 12, pp. 5446-5456.
8. Klein U., Dalla-Favera R. New insights into the pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Seminars in Cancer Biology*, 2010, Vol. 20, no. 6, pp. 377-338.
9. Singer M.K., Assem M., Abdel Ghaffar A.B., Morcos N.Y. Role of TNF-alpha as a survival prognostic marker in chronic lymphocytic leukemia patients. *The Egyptian Journal of Immunology*, 2011, Vol. 18, no. 2, pp. 51-60.

Авторы:

Зотина Е.Н. — к.м.н., младший научный сотрудник научно-клинического отдела ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Загоскина Т.П. — к.м.н., доцент кафедры госпитальной терапии ГБОУ ВПО «Кировская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения РФ, г. Киров, Россия

Шардаков В.И. — д.м.н., профессор, руководитель лаборатории иммунологии лейкозов ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

Йовдий А.В. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории иммуногематологии ФГБУН «Кировский научно-исследовательский институт гематологии и переливания крови Федерального медико-биологического агентства», г. Киров, Россия

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

Authors:

Zotina E.N., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Clinical Research Department, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Zagoskina T.P., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Hospital Therapy, Kirov State Medical Academy, Kirov, Russian Federation

Shardakov V.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Leukemia Immunology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

Yovdy A.V., PhD (Medicine), Junior Researcher Associate, Laboratory of Immunohematology, Kirov Research Institute of Hematology and Blood Transfusion, Kirov, Russian Federation

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

Поступила 13.05.2016
Принята к печати 31.05.2016

Received 13.05.2016
Accepted 31.05.2016

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) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т.д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел «**Благодарности**» не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано

выше. Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-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

Абакушина Е.В.	405	Здзиковецкий Д.Э.	475	Останин А.А.	425
Анохин Ю.Н.	405	Зорин Н.А.	483	Перепанова Т.С.	469
Архипов С.А.	459	Зорина В.Н.	483	Промзелева Н.В.	483
Аутеншлюс А.И.	459	Зорина Р.М.	483	Ригер Н.А.	437
Беренштейн А.В.	469	Зотина Е.Н.	489	Рябичева Т.Г.	483
Блинова Д.Д.	425	Зурочка А.В.	443	Савченко А.А.	475
Богомоллова Е.Г.	417	Иванов В.А.	451	Свитич О.А.	469
Борисов А.Г.	475	Йовдий А.В.	489	Симбирцев А.С.	417
Вараксин Н.А.	459	Карпухина К.В.	459	Соловьев К.А.	459
Волкова Е.М.	469	Кунц Т.А.	459	Сорокина Л.Н.	451
Ганковская Л.В.	469	Леплина О.Ю.	425	Старостина Н.М.	425
Гвоздев И.И.	475	Лим В.В.	451	Трофимов В.И.	451
Духовлинов И.В.	417	Минеев В.Н.	451	Тыринова Т.В.	425
Евстратова В.С.	437	Михайлова Е.С.	459	Федорова Е.А.	417
Емелина Ю.Н.	443	Могильная Е.Д.	459	Ханферьян Р.А.	437
Желтова О.И.	425	Нёма М.А.	451	Черных Е.Р.	425
Загоскина Т.П.	489	Никитюк Д.Б.	437	Шардаков В.И.	489
Зайцева Г.А.	489	Олейник Е.А.	425		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активация лимфоцитов.....	405	поликлональные активаторы.....	460
аллергенспецифическая иммунотерапия.....	443	поллиноз.....	443
альфа-2-макроглобулин.....	484	прогноз.....	489
бронхиальная астма.....	451	протективность.....	417
вакцина.....	417	противоопухолевый иммунный ответ.....	405
врожденный иммунитет.....	469	рак молочной железы.....	460
герпес.....	425	регуляция.....	476
гистаминовые рецепторы.....	437	респираторный взрыв.....	476
дендритные клетки.....	425, 437	ротавирусный гастроэнтерит.....	417
дефенсины.....	469	сепсис.....	476
иммунитет.....	437	система SOCS-белков.....	451
иммунокомпетентные клетки крови.....	460	слизистая оболочка.....	469
индексы соотношения цитокинов.....	443	супернатант.....	484
инфекции мочевыводящих путей.....	469	сыворотка крови.....	484
колоректальный рак.....	484	фактор некроза опухоли-альфа.....	489
культура клеток.....	484	фотодинамическая терапия.....	405
лабораторная модель ротавирусной		хемокины.....	437
инфекции.....	417	хронический лимфолейкоз.....	489
лечебные вакцины.....	425	цитокины.....	437, 443, 460, 476, 489
митоген.....	484	IFN γ	484
молекулы MICA.....	405	IL-6.....	484
моноклеарные клетки.....	451	NKG2D.....	405
моноклеарные клетки		NK-клетки.....	405
периферической крови.....	437	SOCS3.....	451
нейтрофилы.....	476	SOCS5.....	451
общая выживаемость.....	489	TNF α	484
онкологические заболевания.....	405	Toll-подобные рецепторы.....	469
перитонит.....	476		
пилотное исследование.....	425		