

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

Том 18, № 6. С. 499-598

2016

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

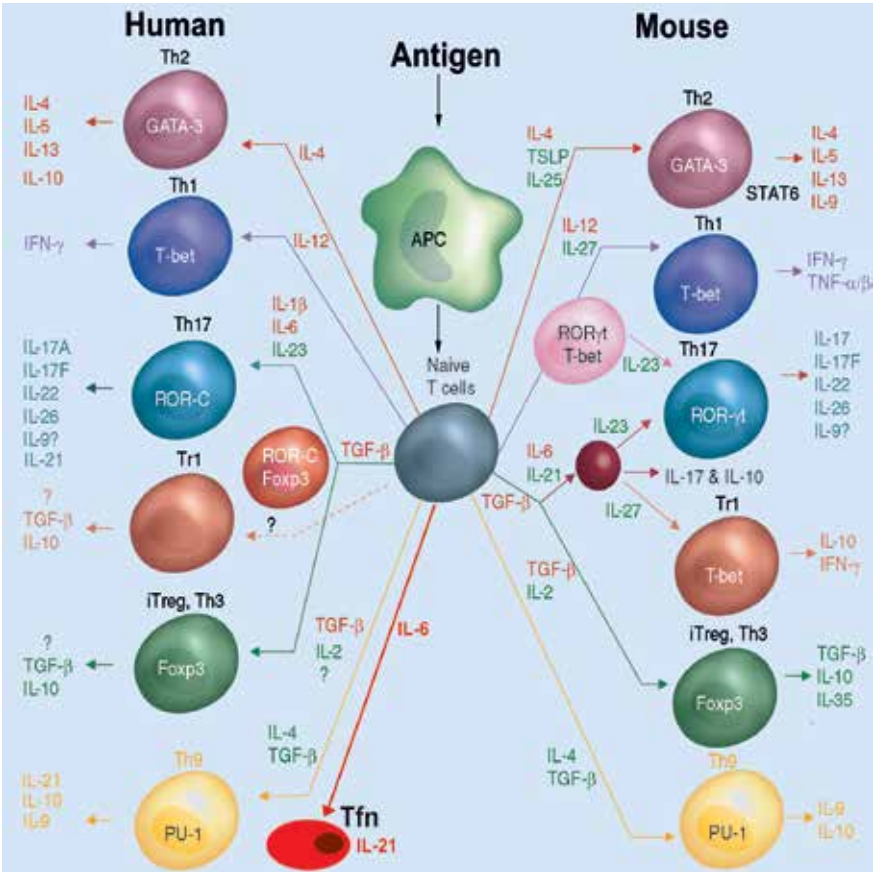


Figure 1. The main paths of naive Th0-lymphocyte (Naive T-cell) differentiation and their production of cytokines (modified from S. Saito et al., 2011 and M.H. Kaplan et al., 2015 [45, 101])

Note. APC – antigen-presenting cell. The factors of GATA-3, T-bet, ROR-γt, FoxP3, PU-1, ROR-γt transcription expressed in respective T-lymphocyte subpopulations are shown in the Figure.

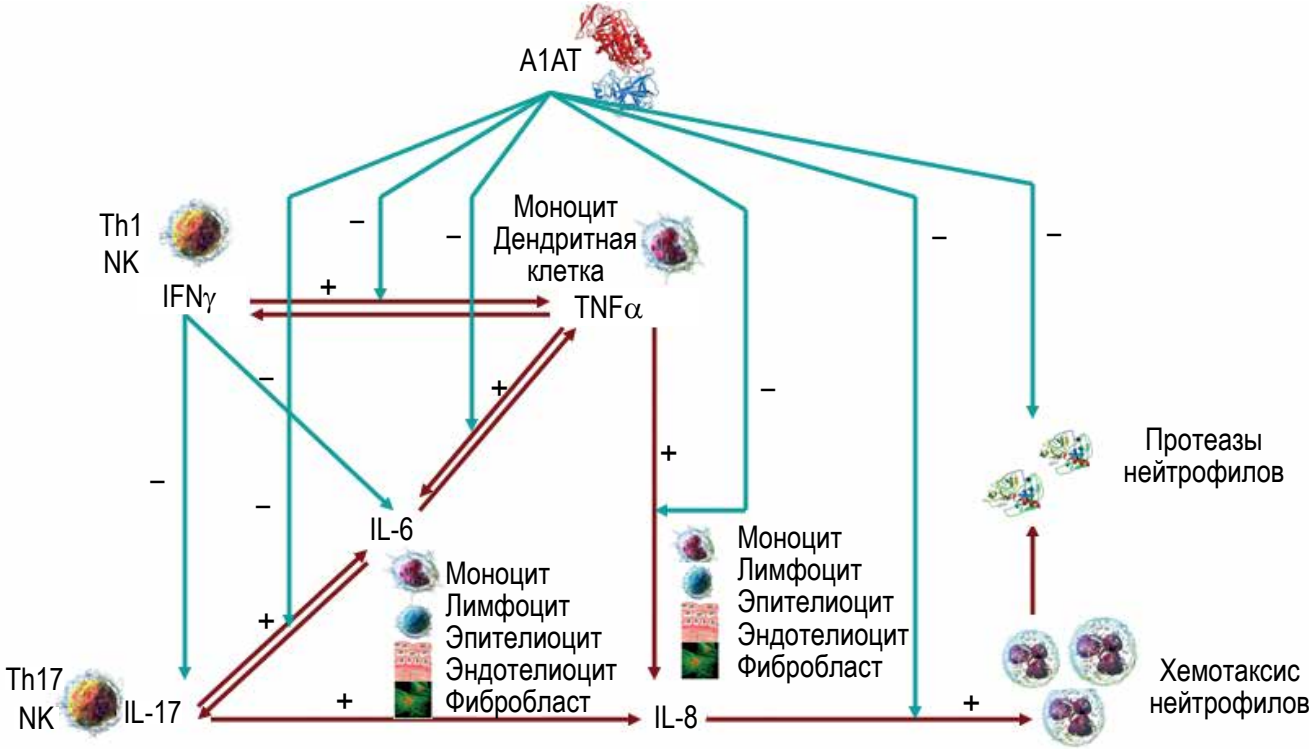


Рисунок 6. Модулирующий эффект A1AT на провоспалительные цитокины
Примечание. Th – Т-хелпер, NK – натуральный киллер.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

ноябрь-декабрь

2016, том 18

№ 6

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

Фрейдлин Ирина Соломоновна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии 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 21.10.2016 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 12,5. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1306

Напечатано в ООО «ИПК Береста».

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

Тел.: (812) 388-90-00

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

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

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

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

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

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

November-December

2016, volume 18

No. 6

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, 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. Kettlinskij – 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 21.10.2016. 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

Горшкова Е.Н., Василенко Е.А., Тиллиб С.В., Астраханцева И.В.

**ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА И БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ИХ ОСНОВЕ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ** 505

Соколов Д.И., Степанова О.И., Сельков С.А.

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺Т-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ..... 521

Оригинальные статьи

Первакова М.Ю., Лапин С.В., Суркова Е.А., Ткаченко О.Ю., Будкова А.И., Гусева В.И., Титова О.Н., Эмануэль В.Л.,
Тотолян Арег А.

**ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОФИЛЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ
ФЕНОТИПАМИ АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА**..... 537

Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Грабовская К.Б., Филимонова В.Ю., Лайно Д., Виллена Д., Альварес С., Даниленко В.Н.,
Суворов А.Н.

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ В КАЧЕСТВЕ АДЪЮВАНТОВ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ
ХИМЕРНОЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНОЙ** 545

Старикова Э.А., Карасева А.Б., Бузова Л.А., Суворов А.Н., Соколов А.В., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С.

**РОЛЬ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ STREPTOCOCCUS PYOGENES M49-16 В ИНГИБИЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ
ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ EA.hy926** 555

Лаптева А.М., Коленчукова О.А., Смирнова С.В.

**ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА И НАЗАЛЬНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА ПРИ ПОЛИПОЗНОМ
РИНОСИНСИТЕ И АСТМАТИЧЕСКОЙ ТРИАДЕ** 563

Краткие сообщения

Друцкая М.С., Горшкова Е.А., Жданова А.С., Атретханы К.-С., Гоголева В.С., Зварцев Р.В., Круглов А.А.,
Недоспасов С.А.

**РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 6 В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ, ВЫЗВАННОМ ПЕРЕНОСОМ АРТРИТОГЕННЫХ
АНТИТЕЛ**..... 569

Умнякова Е.С., Кудрявцев И.В., Грудинина Н.А., Баландин С.В., Болосов И.А., Пантелеев П.В., Филатенкова Т.А.,
Орлов Д.С., Цветкова Е.В., Овчинникова Т.В., Кокряков В.Н., Шамова О.В.

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АЦИПЕНСИНА 1 В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА..... 575

Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Лаврина С.Г., Шершнев В.Н.

**РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ У ДЕТЕЙ
В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ** 583

Куртасова Л.М., Зуков Р.А., Семенов Э.В.

**ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ОНКОУРОЛОГИЧЕСКИХ
БОЛЬНЫХ В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ** 589

Правила для авторов 595

Авторский указатель 598

Предметный указатель 598

CONTENTS

Reviews

Gorshkova E.N., Vasilenko E.A., Tillib S.V., Astrakhantseva I.V.

SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND BIOENGINEERING DRUGS ON THEIR BASIS: NEW OPPORTUNITIES FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY 505

Sokolov D.I., Stepanova O.I., Selkov S.I.

THE ROLE OF THE DIFFERENT SUBPOPULATIONS OF CD4⁺T LYMPHOCYTES DURING PREGNANCY 521

Original articles

Pervakova M.Yu., Lapin S.V., Surkova E.A., Tkachenko O.Yu., Budkova A.I., Guseva V.I., Titova O.N., Emanuel V.L., Totolian Areg A.

PROINFLAMMATORY CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH DIFFERENT ALPHA-1-ANTITRYPSIN PHENOTYPES..... 537

Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Grabovskaya K.B., Filimonova V.Yu., Laiño J., Villena J., Alvares S., Danilenko V.N., Suvorov A.N.

EVALUATION OF LACTOBACILLUS PROBIOTICS AS ADJUVANTS FOR NASAL IMMUNIZATION WITH CHIMERIC PNEUMOCOCCAL VACCINE 545

Starikova E.A., Karaseva A.B., Burova L.A., Suvorov A.N., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Freidlin I.S.

A ROLE OF ARGININE DEIMINASE FROM STREPTOCOCCUS PYOGENES M49-16 IN PROMOTING INFECTION AND INHIBITION OF ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION 555

Lapteva A.M., Kolenchukova O.A., Smirnova S.V.

IMMUNE PARAMETERS AND NASAL MICROFLORA IN PATIENTS WITH POLYPOID RHINOSINUSITIS AND ASTHMATIC TRIAD 563

Short communications

Drutskaya M.S., Gorshkova E.A., Zhdanova A.S., Atrekhany K.-S., Gogoleva V.S., Zvartsev R.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A.

ROLE OF IL-6 IN EXPERIMENTAL ARTHRITIS CAUSED BY TRANSFER OF ARTHRITOGENIC ANTIBODIES 569

Umnyakova E.S., Kudryavtsev I.V., Grudinina N.A., Balandin S.V., Bolosov I.A., Panteleev P.V., Filatenkova T.A., Orlov D.S., Tsvetkova E.V., Ovchinnikova T.V., Kokryakov V.N., Shamova O.V.

INTERNALIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE ACIPENSIN 1 INTO HUMAN TUMOR CELLS..... 575

Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Lavrina S.G., Shershnev V.N.

RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES FOR CHILDREN IN SVERDLOVSK REGION..... 583

Kurtasova L.M., Zukov R.A., Semenov E.V.

FEATURES NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE OF PERIPHERAL BLOOD IN ONCOUROLOGICAL PATIENTS IN THE DISEASE DYNAMICS 589

Instructions to Authors 595

Author index 598

Subject index..... 598

ОДНОДОМЕННЫЕ АНТИТЕЛА И БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ИХ ОСНОВЕ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ

Горшкова Е.Н.¹, Василенко Е.А.¹, Тиллиб С.В.², Астраханцева И.В.¹

¹ ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет имени Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

² ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия

Резюме. Около 20 лет назад у представителей семейства *Camelidae* в сыворотке крови были обнаружены особые неканонические антитела, состоящие только из укороченных тяжелых цепей при полном отсутствии легких. За узнавание антигена у этих необычных антител отвечает только один вариабельный домен. Рекомбинантный белок, являющийся аналогом или производным такого антиген-узнающего вариабельного домена, получил название «однодоменное антитело» (sdAb), или «нанотело» (nanobody), иногда также его называют «наноантитело». С тех пор однодоменные антитела (наноантитела) и их производные нашли широкое применение во многих областях биологии и медицины, открыли новые перспективы для решения таких значимых проблем, как диагностика и терапия рака, инфекционных и аутоиммунных заболеваний, а также нейтрализация ядов и токсинов. Этот обзор посвящен современным исследованиям с применением наноантител, а также освещает перспективы их использования для создания новых диагностических и терапевтических препаратов.

Ключевые слова: однодоменные антитела, верблюжьи антитела, наноантитела, VHH, биспецифические антитела, биоинженерные препараты

SINGLE DOMAIN ANTIBODIES AND BIOENGINEERING DRUGS ON THEIR BASIS: NEW OPPORTUNITIES FOR DIAGNOSTICS AND THERAPY

Gorshkova E.N.^a, Vasilenko E.A.^a, Tillib S.V.^b, Astrakhantseva I.V.^a

^a N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

^b Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Abstract. Almost 20 years ago, a unique class of antibodies devoid of L chains was discovered in *Camelidae* blood serum. Only one variable domain is responsible for antigen recognition in these unusual antibodies. A recombinant protein, which is analogue to such antigen-recognizing variable domain was called the single domain antibody (sdAb), “nanobody” or “nanoantibody”. The single-domain antibodies and their derivatives have been widely used in the field of biology, toxicology and medicine offering new opportunities for diagnosis and treatment of cancer, autoimmune diseases, infectious diseases, and for toxin neutralization. This review focuses on latest researches in the field and concerns some prospectives for creation of nanoantibody-based diagnostic and therapeutic drugs.

Keywords: single-domain antibodies, camel antibodies, nanoantibodies, VHH, bi-specific antibodies, bioengineered drugs

Адрес для переписки:

Горшкова Екатерина Николаевна
ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский
Нижегородский государственный университет
имени Н.И. Лобачевского»
603950, Россия, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23.
Тел.: 8 (831) 419-90-64.
E-mail: e.n.gorshkova@gmail.com

Address for correspondence:

Gorshkova Ekaterina N.
N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod
603950, Russian Federation, Nizhny Novgorod,
Gagarin ave, 23.
Phone: 7 (831) 419-90-64.
E-mail: e.n.gorshkova@gmail.com

Образец цитирования:

Е.Н. Горшкова, Е.А. Василенко, С.В. Тиллиб,
И.В. Астраханцева «Однодоменные антитела
и биоинженерные препараты на их основе: новые
возможности для диагностики и терапии» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 505–520.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-505-520
© Горшкова Е.Н. и соавт., 2016

For citation:

E.N. Gorshkova, E.A. Vasilenko, S.V. Tillib,
I.V. Astrakhantseva “Single domain antibodies and
bioengineering drugs on their basis: new opportunities for
diagnostics and therapy”, *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 6,
pp. 505–520. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-505-520

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-505-520>

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства РФ и Министерства образования и науки РФ (грант № 14.Z50.31.0008) и гранта РФФИ № 16-34-00561 мол_а, а также при частичной поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00081).

Введение

Рекомбинантные антитела широко используются в разных областях биотехнологии и медицины как инструмент для детекции и очистки биомолекул, для диагностики и терапии заболеваний. Разработка и применение терапевтических моноклональных антител относится к наиболее успешной и быстро растущей отрасли биомедицинских технологий. Однако их применение имеет некоторые ограничения, такие как высокая стоимость производства, хранения и поддержания клеток-продуцентов. Относительно большой размер классического антитела может препятствовать проникновению антитела в твердые ткани, а наличие константного домена приводит к повышению неспецифического фона при диагностических исследованиях. В связи с этим создание на основе иммуноглобулинов рекомбинантных молекул, в которых отсутствовали бы домены, не вовлеченные непосредственно в связывание антигена, является актуальной задачей. Большой прорыв в этой области связан с обнаружением у представителей семейства Верблюдовые (*Camelidae*) особых неканонических антител упрощенной структуры и созданием на основе их антиген-узнающих переменных доменов рекомбинантных производных, или однодоменных антител (также называемых наноантителами, или «nanobodies») [55]. Как и канонические антитела, наноантитела способны эффективно и избирательно связываться с широким спектром специфических антигенов. Небольшой размер (12-15 кДа) и другие структурные особенности наноантител в ряде случаев могут обеспечивать им преимущество в практических приложениях по сравнению с полноразмерными антителами, например, приводить к их лучшему проникновению в ткани, к меньшей неспецифической сорбции, к способности узнавать необычные, «скрытые» для классических антител конформационные эпитопы [31, 53]. Наноантитела хорошо связывают целевые молекулы при внутривенном введении, а не связавшиеся молекулы быстро выводятся через почки. Эти свойства позволяют рассматривать наноантитела и их производные в качестве перспективных инструментов для диагностики и терапии [4, 84, 115]. На сегодняшний день наноантитела используются как зонды для молекулярной визуализации, на их основе разрабатываются лекарственные средства, характеризующиеся быстрым и высокоспецифичным

молекулярным взаимодействием с ограниченным сроком действия во времени, такие как антикоагулянты или нейтрализаторы токсинов [64, 113]. Кроме того, небольшой размер наноантител позволяет создавать длительно циркулирующие в организме многомерные комплексы для терапии хронических заболеваний [65, 115, 120]. Таким образом, наноантитела и комплексы на их основе на данный момент представляют собой перспективный инструмент, который позволит в будущем эффективно решать диагностические и терапевтические задачи.

1. Особенности строения наноантител

До открытия наноантител наименьшим фрагментом природного происхождения, сохраняющим антиген-связывающую специфичность полноразмерного антитела, был синтетический продукт, состоящий из N-концевого переменного домена H-цепи (VH) и N-концевого переменного домена L-цепи (VL), соединенных коротким пептидным линкером (ScFv, молекулярная масса 30 кДа). Однако в 1993 г. группой бельгийских ученых было сообщено, что представители семейства *Camelidae*, помимо классических (рис. 1A), обладают уникальным классом антител («heavy-chain antibody», HCAb), представляющих собой димер укороченной на один домен (CH1) тяжелой цепи и при этом полностью лишенных L-цепей (рис. 1B) [55]. Подобные функциональные антитела позднее также были обнаружены у акул (*Orectolobus maculatus*, *Ginglymostoma cirratum*) и представителей семейства химеровых (*Chimaeridae*). У хрящевых рыб антитела (Ig-NAR) обладают гомодимерными H-цепями, каждая из которых состоит из одного переменного антиген-связывающего домена и пяти константных доменов (рис. 1B) [44]. Подробное исследование молекулярной организации антител верблюдов и хрящевых рыб показало, что антитела H2-типа распознают свой антиген одним единственным доменом: VHH или V-NAR соответственно. Кристаллическую структуру VHH можно описать формой вытянутого шара нанометрового размера (около 4,2 нм в длину и 2,5 нм в диаметре) (рис. 1Г) [30], поэтому соответствующее VHH-домену однодоменное антитело получило название «nanobody» (нанотело), или «наноантитело» [4].

Подобно человеческому VH-домену VHH-домен верблюда состоит из трех определяющих комплементарность гиперпеременных участков (CDR), разделенных четырьмя более консервативными каркасными (framework) областями (FR1-4), в совокупности образующими пространственную структуру из двух β-складчатых слоев. CDR-участки расположены внутри петель, соединяющих структурные элементы β-складчатого слоя и кластеризуются на одной стороне переменного домена, образуя паратоп [85].

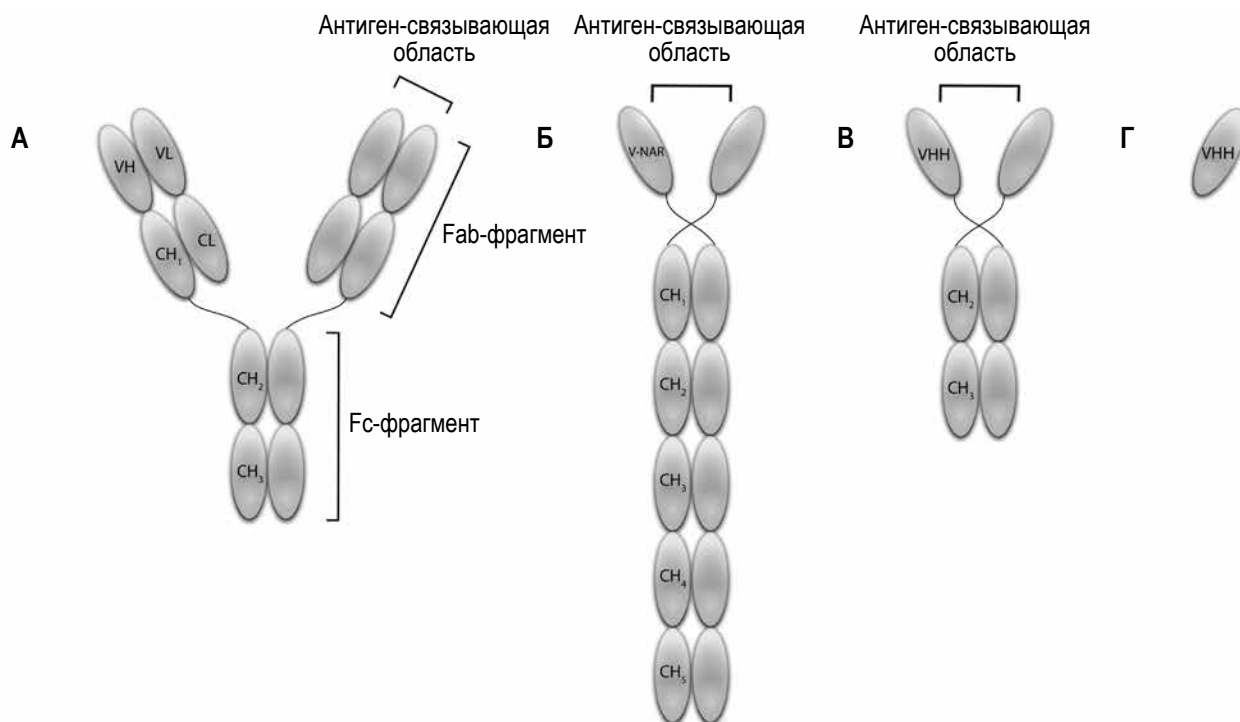


Рисунок 1. Схематическое изображение антител человека (А), хрящевых рыб (Б), представителей семейства *Camelidae* (В) и наноантител (Г)

Несмотря на схожесть структуры VH и VHH доменов, последний имеет ряд отличительных особенностей, в частности повышенную растворимость за счет замены гидрофобных аминокислот на более гидрофильные [56, 85] во втором каркасном участке и особое конформационное разнообразие, обеспечиваемое большей общей аминокислотной вариабельностью и заметным удлинением длины гипервариабельных участков CDR1 и CDR3, а также частым наличием дополнительных стабилизирующих пространственную структуру Cys-Cys-связей между гипервариабельными участками [23]. Такая структурная и пространственная организация антиген-связывающей петли VHH обеспечивает более эффективное взаимодействие с глубокими участками (щелями и бороздами) на поверхности антигена (например, с каталитическим центром ферментов), по сравнению с паратопами ScFv [31], что, в частности, позволяет модулировать функции мишени [59].

Наноантитела отличаются повышенной стабильностью и низкой склонностью к агрегации, могут храниться в течение нескольких месяцев при 4 °C и выдерживают нагревание до 60–80 °C, после чего сохраняют полную антиген-связывающую активность [85]. Наноантитела также устойчивы к денатурирующим условиям: высоким концентрациям мочевины и гуанидина [39] и, кроме того, обладают способностью к эффективной ренатурации («рефолдингу») [43]. Стабильность и специфичность связывания наноантител определяются преимущественно свойствами

аминокислот CDR3-последовательности [40], участвующей в образовании контактов с антигеном, и замена аминокислот в этой области может привести к существенной потере сродства к антигену [14]. Следствием небольшого размера наноантител является их быстрое выведение из организма через почки. В среднем время полужизни мономерных наноантител *in vivo* не превышает 2 ч, что намного короче времени полужизни моноклональных антител (мАт). Короткое время жизни идеально подходит для различных целей, включая мобилизацию стволовых клеток, нейтрализацию и выведение токсина, а также получение особо четких (с уменьшенным неспецифическим фоном) изображений *in vivo* [83]. С другой стороны, создание многомерных конструкций, ПЭГилирование или пришивка специальных белков (сывороточного альбумина) позволяет увеличить время полужизни наноантител до нескольких недель, что может быть необходимо при создании терапевтических агентов для лечения хронических заболеваний [124].

С целью генерирования антиген-специфических наноантител чаще всего в начале проводят иммунизацию представителей семейства Верблюдовые, обычно ламу, альпаку или одnogорбого верблюда, реже для иммунизации используют двугорбого верблюда [5]. После иммунизации проводят ПЦР-клонирование всего репертуара кодирующих последовательностей наноантител на базе выделенной РНК из лимфоцитов иммунизированного животного, после чего из полученной библиотеки последовательностей

методом фагового дисплея отбирают клоны наноантител с требуемой специфичностью.

Наноантитела не требуют посттрансляционных модификаций, поэтому они могут быть относительно просто синтезированы в самых различных экспрессионных системах. Чаще всего для аналитических целей их получают в специальных штаммах *E. coli* в виде растворимых и неагрегирующих рекомбинантных белков [9]. Высокий уровень продукции наноантител был также показан для дрожжевых систем, таких как *Saccharomyces cerevisiae* и *Pichia pastoris* [46]. Одним из альтернативных источников получения наноантител могут быть и трансгенные растения [95]. Было показано, что наноантитела, полученные в генномодифицированных растениях, имеют высокую биологическую активность [21].

2. Наноантитела как диагностические препараты

Эффективное и специфичное таргетирование в сочетании с быстрым выведением несвязавшегося белка из крови и тканей — отличительные черты наноантител, которые делают их идеальными маркерами для визуализации биологических процессов *in vivo* без повреждения органов и тканей исследуемого организма (биоимиджинг) [94]. Физико-химические свойства и небольшие размеры наноантител приводят к чрезвычайно быстрому распределению молекул по органам и тканям [47, 121].

При адаптации наноантитела для визуализации могут вводиться модификации в его аминокислотный состав, не нарушающие эффективность связывания. Например, было показано, что лизин в антиген-связывающих петлях наноантитела порой негативно влияет на эффективность взаимодействия с мишенью и может быть заменен на близкий по свойствам аминокислотный остаток, а введение определенных дополнительных аминокислот в каркасные области иногда может обеспечить улучшенную специфичность маркировки [47].

Наноантитела могут быть слиты с различными маркерами, используемыми для визуализации, такими как короткоживущие ПЭТ-радиоизотопы [48], флуоресцентные нанокристаллы (квантовые точки) [54, 109], микропузырьки [38], флуоресцентные белки [78, 99, 118]. Это позволяет использовать их в ядерной томографии (однофотонной эмиссионной компьютерной томографии (ОФЭКТ) и позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) с использованием радионуклидов), оптической томографии и для ультразвуковой визуализации с использованием микропузырьков.

Комплекс наноантитела, связанного с радиоактивным технецием ^{99m}Tc -7C12, был описан как перспективный зонд для неинвазивной радиоиммунной детекции рака, так как имел вы-

сокую степень поглощения опухолью, низкую аккумуляцию в печени, а также быстрое выведение из крови [47]. Меченые ^{99m}Tc наноантитела против паратоп М-белка, экспрессируемого 5T2-клетками множественной миеломы, были использованы для контроля прогрессирования заболевания неинвазивным путем при минимальных остаточных признаках заболевания [27]. Аналогичные комплексы ^{99m}Tc с наноантителами против маннозного рецептора макрофагов были использованы для мониторинга и количественной оценки воспаления суставов в коллаген-индуцированном артрите [93]. Наноантитела в качестве таргетных молекул были также использованы для неинвазивного доклинического скрининга молекул HER2 [92], фактора роста гепатоцитов (HGF) [124], простата-специфического мембранного антигена (PSMA) [42] с целью диагностики рака молочной железы, рака предстательной железы, а также для мониторинга терапии рака с помощью ОФЭКТ и ПЭТ [34]. Благодаря способности наноантител быстро и специфически связываться с антигенами, а также благодаря быстрому выведению несвязавшихся наноантител из крови, при использовании короткоживущих ПЭТ-радиоизотопов, сшитых с наноантителами, значительно снижается нежелательная излучательная нагрузка на пациента [32].

Многофотонная микроскопия с использованием нанозондов, состоящих из квантовых точек, функционализированных наноантителами, была успешно использована для визуализации карциноэмбрионального антигена [54] и HER2 при раке легких и молочной железы [96].

Ультразвуковой имиджинг («imaging», визуализация) с использованием микропузырьков, соединенных стрептавидин-биотиновой связкой с наноантителами, специфичными к молекулам адгезии сосудистого эндотелия-1 (VCAM-1), позволил отслеживать изменение интенсивности отраженного сигнала в опухоли спустя 10 мин после введения [38].

Визуализация в ближней инфракрасной области (БИК) была успешно внедрена для получения изображений при наведении в хирургии. Так, наноантитела против рецептора эпидермального фактора роста, конъюгированные с IRDye 800CW, позволили при хирургическом вмешательстве в режиме реального времени визуализировать опухоли во время резекции ортотопического рака языка и шейных метастазов в лимфатических узлах [118]. С помощью этой же методики были получены изображения распределения в организме миелоидных клеток, что может быть полезным для диагностики иммунных и воспалительных реакций при онкологических или аутоиммунных заболеваниях [97].

Наноантитела, слитые с флуоресцентной меткой («chromobody»), могут быть использо-

ваны для визуализации внутриклеточных процессов [86, 99]. С помощью этого подхода исследователям удастся достигать нанометрового пространственного разрешения с минимальной погрешностью при анализе живых клеток [34]. Использование наноантител в этом случае дает большое преимущество, поскольку обеспечивает максимальную точность при определении локализации единичных молекул ввиду много меньшего размера наноантител по сравнению с классическими антителами [60, 90]. Уже доказано, что «chromobodies» способны обнаруживать антигены в хроматине, репликационных комплексах, цитоскелете, и их использование позволяет визуализировать динамические изменения во время клеточного цикла в реальном времени [99]. А поликатионная реструктуризация поверхности наноантител позволяет облегчать их проникновение во внутриклеточное пространство [15].

Наноантитела, слитые с флуоресцентным белком, могут служить хорошим инструментом для формирования изображения при изучении динамики и функций внутриклеточных белков [74, 82]. Например, активность и эффективность флуоресцентного наноантитела против поли(АДФ-рибоза)-полимеразы 1 (PARP1) была подтверждена в экспериментах *in vitro*, что позволяет рассматривать их в качестве уникального и универсального инструмента для фундаментальных и прикладных исследований биологии PARP1 и репарации ДНК [16].

Также было показано, что с помощью флуоресцентных наноантител, способных связываться с виментином — белком промежуточных филаментов тканей мезодермального происхождения, можно отслеживать такие сложные процессы, как эпителиально-мезенхимальный переход, что впоследствии может сыграть важную роль в диагностике онкологических заболеваний [78]. Наноантитела, экспрессируемые непосредственно в исследуемой клетке, могут распознавать и отслеживать антигены в различных клеточных компартментах. Было создано «chromobody» против ядерной ламины, которое может применяться для визуализации ядерной оболочки в живых клетках, что позволяет их использовать, например, для изучения апоптоза [99]. Для исследований клеточного цикла была создана клеточная линия HeLa-CCC, в которой происходит экспрессия внутриклеточного функционального однодоменного антитела против ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), слитого с красным флуоресцентным белком TagRFP (так называемое PCNA-chromobody). PCNA-chromobody опознает и описывает распределение эндогенного PCNA, не нарушая его функций. В последнее время данный подход был успешно применен в анализе клеточного цикла как на

уровне отдельной клетки, так и на организменном уровне [17, 88, 104].

Были разработаны наноантитела, которые имеют молекулярную массу 14,7 кДа и обладают сравнительно высокой аффинностью к TNF человека, при этом не влияют на биологическую активность этого цитокина. Полученные наноантитела могут стать платформой для создания многомерных конструкций, которые могут служить TNF-связывающим модулем для создания биоинженерных флуоресцентных сенсоров TNF, а также в качестве ингибиторов системных TNF-эффектов, работающих по принципу удержания TNF в месте его синтеза [3].

Относительная простота экспрессии однодоменных антител в различных системах по сравнению с рекомбинантными антителами делает наноантитела перспективными и экономически выгодными претендентами на использование в тест-системах для *in vitro* диагностики.

Были получены наноантитела, способные взаимодействовать с фактором роста эндотелия сосудов VEGF-A₁₆₅, который входит в число биомаркеров патологических состояний человека. Была показана возможность применения таких наноантител для количественной детекции VEGF A₁₆₅ с помощью иммуоферментного анализа, а также для блокировки биологической активности VEGF-A₁₆₅. Полученные результаты послужили основой для создания диагностикума для количественного определения VEGF-A₁₆₅, а также разработки на основе наноантител препарата для блокировки VEGF-A₁₆₅-зависимого патологического неоангиогенеза [6]. Также было показано, что наноантитела способны связываться с ионами меди, что открывает новые возможности для развития окислительно-восстановительных систем детекции на основе белков, таких как твердотельное электрохимическое зондирование [108]. Легкость манипулирования способна сделать их идеальными кандидатами на роль элементов распознавания в биосенсорных платформах. Кроме того, небольшой размер наноантител может послужить большим преимуществом при создании диагностических систем с высокой степенью чувствительности при минимальном объеме образца [106].

Было показано, что наноантитела могут проникать и через гематоэнцефалический барьер, предположительно путем трансцитоза [7, 100]. Кроме этого, благодаря своему строению (маленькому размеру и высокой пластичности) наноантитела могут распознавать эпитопы, которые не являются иммуногенами для классических моноклональных антител [31, 36, 37]. Так, было описано, что наноантитела распознают олигомерные формы бета-амилоида, что может позволить использовать их в диагностике болезни Альцгеймера [76].

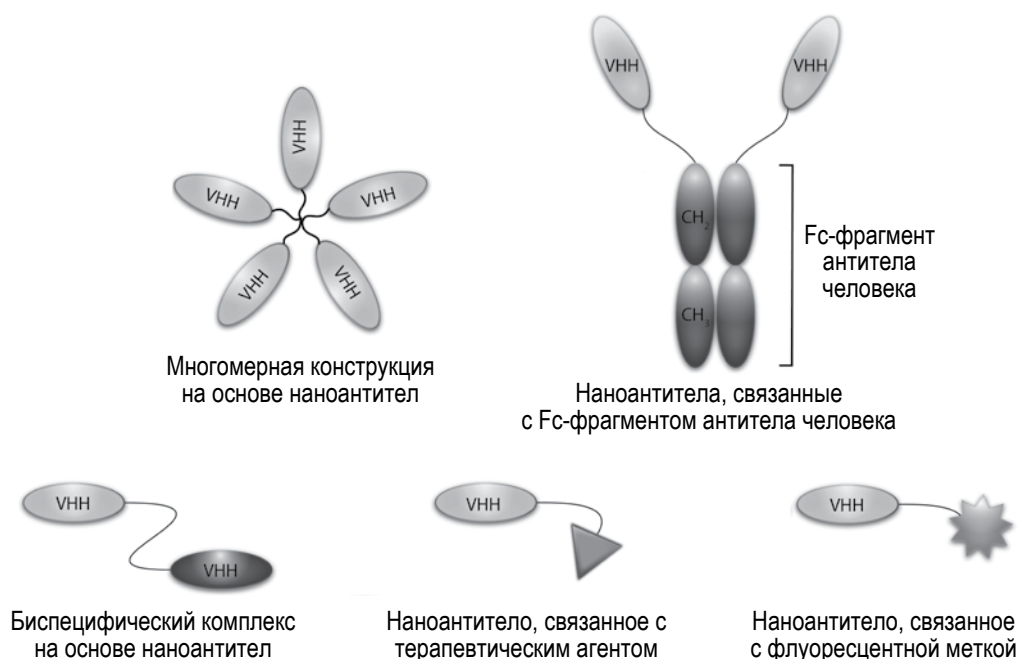


Рисунок 2. Варианты терапевтических конструкций, созданных на основе наноантител

3. Применение наноантител в терапии

Появление устойчивых к антибиотикам штаммов микроорганизмов потребовало разработки новых стратегий лечения, например, использование антител, которые, в отличие от антибиотиков, могут распознавать широкий спектр антигенов, нейтрализовать факторы вирулентности, помогающие иммунной системе хозяина взаимодействовать с микроорганизмом, а также предотвращать рецидивы заболевания [66]. Кроме того, антитела используются в лечении вирусных инфекций [103, 122] и для нейтрализации токсинов [63, 64, 126]. Появление цитокин-нейтрализующих антител совершило переворот в терапии ревматоидного артрита, псориаза и других хронических воспалительных заболеваний [1]. Таргетная терапия онкологических процессов с использованием моноклональных антител также активно прогрессирует в течение последних 30 лет [49].

Способность наноантител преодолевать гемато-энцефалический барьер [100], их устойчивость к протеолитической деградации в желудочно-кишечном тракте [58], возможность ингаляционного введения являются значимыми преимуществами использования наноантител в качестве терапевтических агентов [119]. Важным фактором технологического использования наноантител является низкая себестоимость процесса, высокий выход продукта и разнообразие продуцирующих штаммов: ими могут быть грамположительные бактерии *L. Paracasei* (используют для производства сыра) [68], грамотрицательные бактерии и низшие эукариоты, такие как *S. cerevisiae* [122]. Кроме того, одно-

доменная структура наноантител позволяет формировать поливалентные или мультиспецифические конструкторы, которые могут служить удобным инструментом для создания модифицированных и многофункциональных агентов. Небольшой размер генных фрагментов наноантител (около 400 п.н.) облегчает последующие молекулярные манипуляции для создания различных поливалентных комплексов [102], которые дают многократное увеличение avidности по сравнению с исходными одновалентными структурами [79]. Бивалентные наноантитела могут быть соединены линкером [22] или связаны с Fc-фрагментом классического антитела, который может вызывать антитело-зависимую клеточную цитотоксичность. Для продукции таких комплексов могут использоваться различные экспрессионные системы [29, 33]. Многообразие комплексов на основе наноантител представлено на рисунке 2.

Мультимеризация позволяет продлить время жизни наноантител в организме, что является важным при использовании их как терапевтических агентов для лечения хронических заболеваний. С этой целью в том числе используется восстановление генно-инженерных наноантител до полноразмерной формы путем добавления Fc-области, что продлевает время пребывания наноантител в кровотоке за счет увеличения размера молекулы [63]. Используется также сшивка наноантител с сывороточным альбумином. Было показано, что время выведения из организма таких антител увеличивается во много раз, и данная тенденция не является видоспецифичной [65].

3.1. Наноантитела для терапии бактериальных и вирусных инфекций

Одним из видов патогенных микроорганизмов, которые могут служить мишенью для терапевтических наноантител, являются бактерии *Mycoplasma hominis*, участвующие в развитии не только воспалительных заболеваний органов малого таза, но и в последующей онкологической трансформации (например, рака простаты). Специфическое наноантитело aMh против *M. hominis* было слито с Fc-фрагментом IgG для улучшения проникновения в слизистые оболочки половых путей, что оказало не только лечебное, но и профилактическое воздействие в мышинной модели генитальной инфекции *M. hominis* [18]. В этой работе также была продемонстрирована возможность эффективной доставки и последующей внутриклеточной экспрессии генов наноантител с помощью вектора на основе модифицированного аденовируса.

Наноантитела против рекомбинантного белка UreC специфически связывают мишень и ингибируют активность уреазы, что может быть использовано для борьбы с *Helicobacter pylori*, вызывающей развитие гастрита, дуоденита и других заболеваний [10]. Применение антибиотиков не только уничтожает полезную микрофлору кишечника, но и является одной из главных причин развития тяжелых инфекционных заболеваний, таких как псевдомембранозный колит, возбудителем которого является *Clostridium difficile*. SLP-специфические наноантитела из ламы, направленные на специфическое узнавание поверхностных белков *C. difficile*, продемонстрировали ингибирующий эффект в отношении жизнедеятельности этих бактерий [71].

Поливалентные наноантитела, состоящие из VHH-доменов, могут стать мощным инструментом для терапии резистентных вирусных инфекций, обусловленных высокой вариабельностью вируса, в том числе ВИЧ, вирусов гриппа, гепатита В и некоторых других [12, 67].

Создание двух- или трехвалентного наноантитела против высокопатогенного вируса гриппа H5N1 путем слияния генетической последовательности нескольких H5-специфических моновалентных наноантител, разделенных глицин-сериновым линкером, значительно увеличивало их нейтрализующую активность [69]. Для увеличения противовирусной активности наноантител может быть использовано форматирование, включающее в себя добавление особого типа биспиральных последовательностей — изолейциновых молний. Было показано, что внутрибрюшинное или интраназальное введение полученных после такой модификации наноантител за 2 ч до или через 24 ч после вирусного заражения способно специфически защищать мышей от летальной инфекции вирусом гриппа H5N2 [111].

В качестве альтернативы классической вакцины для защиты от вируса бешенства также могут служить наноантитела. Примером могут послужить наноантитела лам, иммунизированных инактивированной антирабической вакциной Merieux HCDV (генотип 1). При этом мультимеризация этих моновалентных наноантител способна многократно (на 3–4 порядка) увеличивать их нейтрализующие свойства [67].

Наноантитела могут использоваться также для нейтрализации пикорнавирусов, таких как вирус полиомиелита [110] и вирус ящура [57].

Одной из потенциально перспективных альтернатив терапии ротавирусов может быть пероральное использование *S. cerevisiae*, продуцирующих нейтрализующие наноантитела. Такой подход продемонстрирован в мышинной модели ротавирусной инфекции [116]. Использование для той же цели лактобактерий позволяет усилить противовирусный эффект *in vivo*, по-видимому, за счет продукции ими лактата [87].

Одной из наиболее острых задач остается разработка эффективной терапии ВИЧ-инфекции. Мультимеризация белка Rev необходима для экспорта мРНК ВИЧ в цитоплазму, где происходит репликация вируса, что делает этот белок перспективной терапевтической мишенью. Было получено наноантитело Nb190, которое способно ингибировать белок-белковое взаимодействие, не только затрудняя мультимеризацию Rev, но также способствуя разборке уже существующих мультимеров. В итоге было показано, что экспрессия Nb190 в цитоплазме способна дозозависимо ингибировать продукцию ВИЧ [123]. В 2007 году Управлением по контролю качества пищевых продуктов и лекарственных препаратов США (FDA), а также Европейской комиссией был утвержден препарат Maraviroc (Selzentry, или Celsentri) — антагонист рецептора CCR5 — белка, способствующего проникновению ВИЧ в клетку. Этот препарат предотвращает взаимодействие белка gp120 ВИЧ с этим корецептором. Однако ВИЧ может задействовать и другие корецепторы, такие как CXCL12/CXCR4 [84], что предполагает использование их антагонистов для блокировки вируса. Наноантитела, селективно связывающие человеческий CXCR4, эффективно ингибировали репликацию ВИЧ *in vitro*, а также дозозависимо индуцировали мобилизацию стволовых клеток *in vivo* у макаков [70]. За счет взаимодействия с сайтом связывания CD4, эти наноантитела способны нейтрализовать передачу вируса от макрофагов Т-клеткам. При этом наноантитело VHHJ3, восстановленное до полноразмерного Fc, обладало большей нейтрализующей активностью по сравнению с его укороченной формой [80].

Инфицирование вирусом герпеса HSV-2 увеличивает риск заражения ВИЧ [45]. Использо-

вание наноантитела к гликопротеину D (gD2), экспрессируемому на поверхности вириона и обеспечивающего его проникновение в клетки, для профилактики и лечения HSV-2 проиллюстрировано на примере животных моделей заболевания [20]. Наноантитела, связывающие gD2 с помощью R33 домена, не нейтрализовали вирус, однако объединение R33 с цитотоксическим доменом эндотоксина A из *Pseudomonas aeruginosa* позволяло эффективно уничтожать инфицированные вирусом клетки [51]. Были также разработаны наноантитела против филовирсов, например, вируса Марбурга — возбудителя геморрагической лихорадки, они описаны в работе Sherwood и соавт. [105].

Вторую фазу клинических испытаний на данный момент проходят терапевтические наноантитела ALX-0171 (Ablynx) против респираторно-синцитиальновирусной инфекции у детей раннего возраста, которые представляет собой трехвалентное наноантитело, ингибирующее репликацию респираторно-синцитиального вируса путем связывания F-белка на его поверхности и тем самым предотвращая проникновение вируса в клетки [91].

Существует и ряд других возможных применений для наноантител и конструкторов на их основе. Например, возможно создание поливалентных наноантител, распознающих различные эпитопы, что может стать мощным инструментом для терапии резистентных вирусных инфекций [122]. Возможно использование нейтрализующих свойств наноантител и в биотехнологическом производстве, где наноантитела могут выступать в качестве агентов, предотвращающих связывание бактериофагов с их рецепторами, экспрессируемыми на поверхности молочнокислых бактерий. Было показано, что наноантитела против хвостового белка фага TP901-1, обеспечивающего его адгезию на поверхности лактококковых бактерий, полностью нейтрализуют инфекционную активность фага даже после 15 пассажей [35].

3.2. Наноантитела для нейтрализации ядов и токсинов

Антитела замечательны в их способности инактивировать даже самые мощные токсины растений, животных и микробные токсины, в том числе ботулизма, столбняка, дифтерии, сибирской язвы. Как уже упоминалось выше, небольшой размер наноантител, по сравнению с классическими антителами, позволяет создавать многомерные конструкции и эффективно экспрессировать наноантитела в различных системах. Благодаря этим свойствам, а также способности наноантител узнавать особые конформационные эпитопы, например, такие, как активные центры ферментов, использование наноантител может обеспечить более эффективную нейтрализацию токсинов.

Так, биспецифическая конструкция (NbF12-10), содержащая наноантитела NbAahIF12 и NbAahII10, способные эффективно нейтрализовать яд скорпиона *Androctonus Australis*, проявляла гораздо более высокий уровень защиты по сравнению с классической Fab'-терапией [28]. Введение NbF12-10 грызунам *in vivo* не только эффективно предотвращало гемодинамические нарушения, индуцированные летальной дозой яда, но также восстанавливало сердечный ритм и нормализовало кровяное давление у животных [64].

Путем иммунизации однокорбного верблюда ядом скорпиона *Hemiscorpius lepturus* были получены функциональные рекомбинантные наноантитела F7Nb против геминекролизина — самого известного гемолитического и дермoneкротического токсина. Исследования F7Nb *in vivo* показали ингибирование гемолитической активности у всех подопытных животных [63].

Гетеродимеры наноантител в отличие от гомодимеров способны защищать мышей от летальной дозы рицина, несмотря на одинаковую аффинность к рициновому голотоксину и схожие значения концентраций полумаксимального ингибирования (IC50), полученные в ходе цитотоксического теста *in vitro*. Это связано со способностью гетеродимеров провоцировать агрегацию токсина в растворе, что облегчает их связывание в комплекс токсин-антитело на поверхности клеток [61].

Обычно борьба с ботулиническим токсином подразумевает внутривенную инъекцию антисыворотки или моноклональных антител, однако в случаях интоксикации детей через пищеварительный тракт усугубляющим фактором является низкий уровень нормальной микрофлоры, в связи с чем возникает необходимость искать более эффективные терапевтические агенты. В качестве таких агентов могут выступать хлоропласты зеленых водорослей *Chlamydomonas reinhardtii*, продуцирующие VHN мозолоногий, способный связывать ботулинический нейротоксин серотипа A *in vitro* и защищать первичные нейроны крыс *in vivo*. В экспериментах было показано, что пероральное введение таких зеленых водорослей позволяет эффективно нейтрализовать влияние токсина в желудке и тонком кишечнике [11].

Были получены наноантитела, направленные на нейтрализацию компонентов токсинов бактерии *Clostridium difficile*, которая служит основной причиной антибиотик-ассоциированной диареи у госпитализированных пациентов. Гипервирулентные штаммы этого микроорганизма, служащие причиной наиболее высокого уровня смертности, дополнительно производят бинарный токсин CDT (*Clostridium difficile* трансфераза), состоящий из ферментативной субъединицы CdtA, и связывающуюся с рецептором субъединицу CdtB, против которых и были получены

наноантитела. Эти наноантитела могут быть использованы в качестве инструментов для исследований, диагностики и терапии *Clostridium difficile*-ассоциированных заболеваний [114].

3.3. Наноантитела для терапии онкологических заболеваний

Основной стратегией для таргетной терапии онкологических заболеваний является возможность выявлять факторы роста, транскрипционные факторы или рецепторы, экспрессия которых отличается на раковых клетках и их «нормальных» аналогах. Терапевтические антитела способны специфически нацеленно нарушать молекулярные пути, лежащие в основе туморогенеза [50].

Наибольшее распространение на сегодняшний день получило использование противоопухолевых наноантител, связывающихся с различными опухолеассоциированными антигенами [26]. Мишенью для таких наноантител, например, может служить карциноэмбриональный антиген (КЭА), который экспрессируется на опухолевых клетках. Противоопухолевая эффективность была показана в случае анти-КЭА наноантител, слитых с бета-лактамазой, которая в норме не экспрессируется в организме. Входящая в состав препарата бета-лактамаза при связывании наноантитела с КЭА трансформируется из нетоксичной в токсичную форму, тем самым убивая опухолевые клетки [25].

Мишенью для противоопухолевой терапии могут быть трансмембранные белки на поверхности опухолевых клеток. К ним относятся рецепторы фактора роста, такие как EGFR1 и EGFR2 (HER1 и HER2 соответственно), VEGFR2, C-Met и CXCR7 [72]. Наноантитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) были разработаны Roovers и др. посредством отбора фагового дисплея в сочетании с конкурентным элюированием с EGF или цетуксимабом, с целью выбрать антагонистические анти-EGFR наноантитела (в числе которых наноантитела IA1 или EGal) [98]. Некоторые наноантитела против HER2 были отобраны с помощью фагового дисплея на иммобилизованных молекулах HER2 или на клетках, обладающих высоким уровнем экспрессии HER2 [73]. Биспецифические антитела HER2-S-Fab, способные специфически связываться с рецептором эпидермального фактора роста человека (HER2) с помощью Fab-фрагмента препарата моноклонального антитела Трастузумаб и с помощью наноантитела VHH, связывающиеся с CD16-антигеном на поверхности иммунных клеток, продемонстрировали высокую противоопухолевую активность против клеток с HER2-гиперэкспрессией за счет NK-клеточного лизиса [77].

Было также получено наноантитело против рецептора сосудистого эндотелиального фактора

роста 2 (VEGFR2), повышенный уровень которого продемонстрирован для многих видов опухолей [13].

Разработаны наноантитела, блокирующие работу рецептора c-Met, который активируется под действием фактора роста гепатоцитов (HGF) и участвует в клеточной пролиферации при таких заболеваниях, как рак толстой кишки, рак груди, рак яичников, а также при гемобластозах. Было показано, что анти-c-Met-наноантитело способно связываться с HGF, тем самым ингибируя активацию c-Met, пролиферацию и миграцию клеток *in vitro* [52].

Помимо указанных выше, были также получены наноантитела против активирующего ряда сигнальных путей хемокинового рецептора CXCR7, гиперэкспрессия которого наблюдается при раке молочной железы и раке легких [81].

Кроме того, в качестве перспективных агентов в противоопухолевой терапии могут выступать наноантитела против гликопротеинов, экспрессируемых на поверхности опухолевых клеток, например, против MUC-1, гиперэкспрессия которого характерна для рака прямой кишки и рака груди [101].

Для терапии онкологических процессов также были разработаны высокоселективные наноантитела, связывающие и блокирующие активность костных морфогенетических белков разных типов, которые участвуют как в физиологических, так и патологических процессах, в том числе канцерогенезе и опухолевой прогрессии [19].

Была показана возможность создания и использования мишень-специфических носителей на основе рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц (РПАН), содержащих на поверхности направляющее наноантитело. РПАН конструировались на основе генома аденовируса человека серотипа 5 с модифицированным геном капсидного белка pIX (Ad5-EGFP-pIX-ER). Такие РПАН способны с высокой аффинностью связывать на своей поверхности соответственно модифицированные наноантитела, специфически узнающие раково-эмбриональный антиген. Было показано, что Ad5-EGFP-pIX-ER, несущий на поверхности aCEA-RE, способен в 3 раза более эффективно проникать в опухолевые клетки, чем немодифицированные РПАН и препарат Ad5-EGFP-pIX-ER без адсорбции наноантител на поверхности капсида [2].

Свою эффективность продемонстрировали конъюгаты наноантител для целевого воздействия фотосенсибилизаторов на опухоли [8, 107, 117]. Например, были разработаны комплексы, состоящие из наноантитела, направленного на рецептор EGFR, и фотосенсибилизатора (IRDye700DX). Они позволяют идентифицировать клеточные линии с различными уровнями экспрессии EGFR, а также специфически инду-

цировать гибель EGFR-экспрессирующих клеток в наномолярных концентрациях [62]. Кроме того, такой подход позволяет не только проводить терапию онкологического заболевания, но и комбинировать данный процесс с имиджингом опухолевых тканей.

Одним из перспективных направлений противоопухолевой терапии на основе наноантител можно назвать применение комплексов с использованием радиоактивных изотопов (^{99m}Tc , ^{89}Zr , ^{177}Lu). Такие комплексы обладают рядом преимуществ, связанных с особенностями самих наноантител. Например, они обладают быстрой диффузией и активной кинетикой клиренса в организме. Кроме того, они способны эффективно и направленно связываться с мишенями, исключая неспецифическое связывание [27].

3.4. Наноантитела для терапии аутоиммунных заболеваний

Дорогостоящие антицитокиновые препараты, используемые при терапии аутоиммунных заболеваний, могут быть заменены более эффективными и экономически выгодными терапевтическими препаратами на основе наноантител [85]. На сегодняшний день целый ряд препаратов и их прототипов проявили себя в качестве эффективных агентов для иммунотерапии.

TNF-блокирующие наноантитела были выделены из лам, иммунизированных с помощью мышинного и человеческого TNF. Путем слияния анти-TNF наноантител были получены двухвалентные комплексы с повышенной авидностью и более эффективной TNF-нейтрализующей активностью. Данные комплексы более эффективно блокировали TNF по сравнению с коммерческими блокаторами на основе классических моноклональных антител (инфликсимаб и адалимумаб) [24].

Разработаны терапевтические наноантитела против ревматоидного артрита (Vobarilizumab [ALX-0061], Ozoralizumab [ATN-103]), псориаза (ALX-0761) и системной красной волчанки (ALX-0061). Все они на данный момент проходят разные стадии клинических испытаний. ALX-0061, содержащий анти-IL-6R наноантитело, обладает сильным сродством к растворимому IL-6R и блокирует передачу сигнала IL-6 [120]. Эффективность и прочность связывания с IL-6, а также терапевтических эффект данного препарата были подтверждены *in vivo* на приматах. Терапевтический эффект озорализумаба (ozoralizumab) основан на нейтрализации TNF [75]. Препарат ALX-0761 проявляет нейтрализующую активность в отношении IL-17 и представляет собой трехвалентное антитело, специфически связывающееся с IL-17A, IL-17F и человеческим сывороточным альбумином [112]. Пролонгированное действие всех этих препаратов обеспечивается за счет связи с сыво-

роточным альбумином. Такой подход к обеспечению продолжительной циркуляции активных веществ в крови очень характерен для препаратов на основе цитокиновых антител для лечения аутоиммунных заболеваний, поскольку данные заболевания зачастую представляют собой хронический воспалительный процесс [120].

Еще одним возможным вариантом антицитокиновой терапии аутоиммунных заболеваний может являться блокировка TNF из определенных клеточных источников. В работе Efimov et al. была оценена возможность ингибирования TNF миелоид-специфичными ингибиторами (MYSTI) – биспецифическими антителами, созданными на основе наноантител. Они способны связываться с молекулой F4/80 на поверхности миелоидных клеток, одновременно связывая и блокируя биологическую активность человеческого TNF. Эффективность полученных ингибиторов была показана как на культуре макрофагов, полученных из гуманизированных по TNF мышей, так и на самих животных в модели острой LPS/D-галактозамин-индуцированной гепатотоксичности [41].

Были разработаны наноантитела против компонентов системы свертывания крови и склонных к агрегации белков, вовлеченных в процессы развития амилоидных заболеваний. Эти однодоменные антитела, полученные из иммунизированной ламы, имеют способность специфически связывать активированную форму фактора фон Виллебранда (vWF) – ключевого компонента каскада свертывания крови, опосредующего прикрепление тромбоцитов к стенке сосудистого эндотелия. Эти наноантитела могут найти применение в определении уровня активированного фактора Виллебранда в образцах сыворотки [125]. Аналогичные vWF-специфические наноантитела (caplacizumab) уже прошли II фазу клинических испытаний в качестве антитромботического препарата, показав дозозависимое полное ингибирование vWF [89].

Заключение

В данном обзоре в краткой форме изложены разнообразные примеры диагностического и терапевтического использования однодоменных антител (наноантител). Благодаря их структурным особенностям, малому размеру, возможности эффективно конъюгировать с различными молекулами, а также использовать для создания многокомпонентных и многовалентных конструкций, наноантитела, очевидно, представляют собой очень перспективный формат антиген-связывающих молекул. Возможность легко объединять и комбинировать наноантитела с различными специфичностями связывания может быть использована для создания высоко-

селективных и высокоактивных кандидатов на роль лекарственных средств с очень привлекательными фармакологическими характеристиками. Такая стратегия позволяет улучшать свойства этих молекул: увеличивать время выведения из организма, усиливать связь с лигандом или с применением флуоресцентных, магнитных или радиоактивных меток, совмещать терапию с диагностикой. Увеличение количества исследований в данном направлении и наличие пре-

паратов, проходящих клинические испытания, свидетельствуют об их больших перспективах для применения в науке и медицине.

Благодарности

Авторы благодарят С.А. Недоспасова за помощь в подборе материалов для обзора и ценные комментарии и Л.А. Истомина за помощь в подготовке иллюстраций.

Список литературы / References

1. Астраханцева И.В., Ефимов Г.А., Друцкая М.С., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Современная антицитокиновая терапия аутоиммунных заболеваний // Биохимия, 2014. Т. 79, № 12. С. 1607-1618. [Astrakhantseva I.V., Efimov G.A., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Modern anti-cytokine therapy of autoimmune diseases. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12, pp. 1308-1321. (In Russ.)]
2. Гарас М.Н., Тиллиб С.В., Зубкова О.В., Рогожин В.Н., Иванова Т.И., Васильев Л.А. Мишень-специфичная доставка генов с помощью рекомбинантных псевдоаденовирусных частиц, способных эффективно связываться с наноантителами // Acta Naturae (русскоязычная версия), 2014. Т. 2, № 6. С. 102-113. [Garas M.N., Tillib S.V., Zubkova O.V., Rogozhin V.N., Ivanova T.I., Vasilev I.A., Logunov D.Yu., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Esmagambetov I.B., Gribova I.Yu., Bandelyuk A.S., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Construction of a pix-modified adenovirus vector able to effectively bind to nanoantibodies for targeting. *Acta Naturae (russkoyazychnaya versiya) = Acta Naturae*, 2014, Vol. 6, no. 2, pp. 95-105. (In Russ.)]
3. Ефимов Г.А., Хлопчатникова З.В., Сазыкин А.Ю., Друцкая М.С., Круглов А.А., Шилов Е.С., Кучмий А.А., Недоспасов С.А., Тиллиб С. В. Получение и характеристика нового рекомбинантного однодоменного антитела, специфически связывающегося с TNF человека // Российский иммунологический журнал, 2012. Т. 6, № 4. С. 337-345. [Efimov G.A., Khlopchatnikova Z.V., Sazikin A.Yu., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shilov E.S., Kuchmiiy A.A., Nedospasov S.A., Tillib S.B. Isolation and characteristics of a new recombinant single domain antibody that specifically binds to human TNF. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Immunology Journal*, Vol. 6, no. 4, pp. 337-345. (In Russ.)]
4. Тиллиб С.В. «Верблюжий наноантитела» – эффективный инструмент для исследований, диагностики и терапии // Молекулярная биология, 2011. Т. 45, № 1. С. 77-85. [Tillib S.V. «Camel nanoantibody» is an efficient tool for research, diagnostics and therapy. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2011, Vol. 45, no. 1, pp. 66-73. (In Russ.)]
5. Тиллиб С.В., Вятчанин А.С., Муилдерманс С. Молекулярный анализ структуры особых антител *Camelus bactrianus*, состоящих только из тяжелых цепей // Биохимия, 2014. Т. 79, № 12. С. 1382-1390. Tillib S.V., Vyatchanin A.S., Muyltermans S. Molecular analysis of heavy chain-only antibodies of *Camelus bactrianus*. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014, Vol. 79, no. 12. pp. 1382-1390. (In Russ.)]
6. Тиллиб С.В., Иванова Т.И., Лысюк Е.Ю., Ларин С.С., Кибардин А.В., Коробко Е.В., Вихрева П.Н., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Коробко И.В. Наноантитела для детекции и блокирования биологической активности фактора роста эндотелия сосудов A165 человека // Биохимия, 2012. Т. 77, № 6. С. 659-665. [Tillib S.V., Ivanova T.I., Lyssuk E.Yu., Larin S.S., Kibardin A.V., Korobko E.V., Vikhreva P.N., Gnuchev N.V., Georgiev G.P., Korobko I.V. Nanoantibodies for detection and blocking of bioactivity of human vascular endothelial growth factor A165. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2012, Vol. 77, no. 6, pp. 659-665. (In Russ.)]
7. Abulrob A., Sprong H., van Bergen En Henegouwen P., Stanimirovic D. The blood-brain barrier transmigration single domain antibody: Mechanisms of transport and antigenic epitopes in human brain endothelial cells. *J. Neurochem.*, 2005, Vol. 95, pp. 1201-1214.
8. Abu-Yousif A.O., Moor A.C.E., Zheng X., Savellano M.D., Yu W., Selbo P.K., Hasan T. Epidermal growth factor receptor-targeted photosensitizer selectively inhibits EGFR signaling and induces targeted phototoxicity in ovarian cancer cells. *Cancer Lett.*, 2012, Vol. 321, pp. 120-127.
9. Arbabi-Ghahroudi M., Tanha J., MacKenzie R. Prokaryotic expression of antibodies. *Cancer Metastasis Rev.*, 2005, Vol. 24, pp. 501-519.
10. Ardekani L.S., Gargari S.L.M., Rasooli I., Bazl M.R., Mohammadi M., Ebrahimzadeh W., Bakherad H., Zare H. A novel nanobody against urease activity of *Helicobacter pylori*. *Int. J. Infect. Dis.*, 2013, Vol. 17, pp. e723-e728.
11. Barrera D.J., Rosenberg J.N., Chiu J.G., Chang Y.-N., Debatis M., Ngoi S.-M., Chang J.T., Shoemaker C.B., Oyler G.A., Mayfield S.P. Algal chloroplast produced camelid V_HH antitoxins are capable of neutralizing botulinum neurotoxin. *Plant Biotechnol. J.*, 2015, Vol. 73, pp. 389-400.
12. Beekwilder J., van Houwelingen A., van Beckhoven J., Speksnijder A. Stable recombinant alpaca antibodies for detection of Tulip virus X. *Eur. J. Plant Pathol.*, 2008, Vol. 121, pp. 477-485.
13. Behdani M., Zeinali S., Khanahmad H., Karimipour M., Asadzadeh N., Azadmanesh K., Khabiri A., Schoonoghe S., Habibi Anbouhi M., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Muyltermans S. Generation and characterization of a functional Nanobody against the vascular endothelial growth factor receptor-2; angiogenesis cell receptor. *Mol. Immunol. Elsevier Ltd*, 2012, Vol. 50, pp. 35-41.
14. Bond C.J., Marsters J.C., Sidhu S.S. Contributions of CDR3 to VHH domain stability and the design of monobody scaffolds for naive antibody libraries. *J. Mol. Biol.*, 2003, Vol. 332, pp. 643-655.
15. Bruce V.J., Lopez-Islas M., McNaughton B.R. Resurfaced cell-penetrating nanobodies: A potentially general scaffold for intracellularly targeted protein discovery. *Protein Sci.*, 2016, Vol. 25, no. 6, pp. 1129-1137.

16. Buchfellner A., Yurlova L., Nüske S., Scholz A.M., Bogner J., Ruf B., Zolghadr K., Drexler S.E., Drexler G.A., Girst S., Greubel, Reindl C., Siebenwirth J., Romer C., Friedl T., Friedl A.A., Rothbauer U. A new nanobody-based biosensor to study endogenous PARP1 *In vitro* and in live human cells. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, p. e0151041.
17. Burgess A., Lorca T., Castro A. Quantitative live imaging of endogenous DNA replication in mammalian cells. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, pp. e45726.
18. Burmistrova D.A., Tillib S.V., Shcheblyakov D., Dolzhikova I.V., Shcherbinin D.N., Zubkova O.V., Ivanova T.I., Tuhvatulin A.I., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Genetic passive immunization with adenoviral vector expressing chimeric nanobody-Fc molecules as therapy for genital infection caused by *Mycoplasma hominis*. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, pp. e0150958.
19. Calpe S., Wagner K., El Khattabi M., Rutten L., Zimmerlin C., Dolk E., Verrips C.T., Medema J.P., Spits H., Krishnadath K.K. Effective inhibition of bone morphogenetic protein function by highly specific llama-derived antibodies. *Mol. Cancer Ther.*, 2015, Vol. 14, pp. 2527-2540.
20. Chen J., Davé S.K., Simmons A. Prevention of genital herpes in a guinea pig model using a glycoprotein D-specific single chain antibody as a microbicide. *Viol. J.*, 2004, Vol. 1, p. 11.
21. Conrad U., Plagmann I., Malchow S., Sack M., Floss D.M., Kruglov A.A., Nedospasov S.A., Rose-John S., Scheller J. ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock. *Plant Biotechnol. J.*, 2011, Vol. 9, no. 1, pp. 22-31.
22. Conrath K.E., Lauwereys M., Galleni M., Matagne A., Frère J.M., Kinne J., Wyns L., Muyldermans S. β -Lactamase inhibitors derived from single-domain antibody fragments elicited in the Camelidae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, Vol. 45, no. 10, pp. 2807-2812.
23. Conrath K.E., Wernery U., Muyldermans S., Nguyen V.K. Emergence and evolution of functional heavy-chain antibodies in Camelidae. *Dev. Comp. Immunol.*, 2003, Vol. 27, no. 2, pp. 87-103.
24. Coppieters K., Dreier T., Silence K., de Haard H., Lauwereys M., Casteels P., Beirnaert E., Jonckheere H., van de Wiele C., Staelens L., Hostens J., Revets H., Remaut E., Elewaut D., Rottiers P. Formatted anti-tumor necrosis factor α VHH proteins derived from camels show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum.*, 2006, Vol. 54, no. 6, pp. 1856-1866.
25. Cortez-Retamozo V., Backmann N., Senter P., Wernery U., de Baetselier P. Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate. *Cancer Res.*, 2004, Vol. 64, pp. 2853-2857.
26. Cortez-Retamozo V., Lauwereys M., Hassanzadeh Gh.G., Gobert M., Conrath K., Muyldermans S., De Baetselier P., Revets H. Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer*, 2002, Vol. 98, no. 3, pp. 456-462.
27. D'Huyvetter M., Xavier C., Caveliers V., Lahoutte T., Muyldermans S., Devoogdt N. Radiolabeled nanobodies as theranostic tools in targeted radionuclide therapy of cancer. *Expert Opin. Drug Deliv.*, 2014, Vol. 11, no. 12, pp. 1939-1954.
28. Darvish M., Behdani M., Shokrgozar M.A., Pooshang-Bagheri K., Shahbazzadeh D. Development of protective agent against Hottentotta saulcyi venom using camelid single-domain antibody. *Mol. Immunol. Elsevier Ltd*, 2015, Vol. 68, no. 2, pp. 412-420.
29. de Buck S., Nolf J., de Meyer T., Viridi V., de Wilde K., van Lerberge E., van Droogenbroeck B., Depicker A. Fusion of an Fc chain to a VHH boosts the accumulation levels in arabidopsis seeds. *Plant Biotechnol. J.*, 2013, Vol. 11, no. 8, pp. 1006-1016.
30. de Genst E., Saerens D., Muyldermans S., Conrath K. Antibody repertoire development in camelids. *Dev. Comp. Immunol.*, 2006, Vol. 30, no. 1-2, pp. 187-198.
31. de Genst E., Silence K., Decanniere K., Conrath K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S., Wyns L. Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 2006, Vol. 103, no. 12, pp. 4586-4591.
32. de Groeve K., Deschacht N., de Koninck C., Caveliers V., Lahoutte T., Devoogdt N., Muyldermans S., de Baetselier P., Raes G. Nanobodies as tools for *in vivo* imaging of specific immune cell types. *J. Nucl. Med.*, 2010, Vol. 51, no. 5, pp. 782-789.
33. de Meyer T., Laukens B., Nolf J., van Lerberge E., de Rycke, R. de Beuckelaer A., de Buck S., Callewaert N., Depicker A. Comparison of VHH-Fc antibody production in Arabidopsis thaliana, Nicotiana benthamiana and Pichia pastoris. *Plant Biotechnol. J.*, 2015, Vol. 13, no. 7, pp. 938-947.
34. de Meyer T., Muyldermans S., Depicker A. Nanobody-based products as research and diagnostic tools. *Trends Biotechnol. Elsevier Ltd*, 2014, Vol. 32, no. 5, pp. 263-270.
35. Desmyter A., Farenc C., Mahony J., Spinelli S., Bebeacua C., Blangy S. Viral infection modulation and neutralization by camelid nanobodies. *PNAS*, 2013, Vol. 110, pp. E1371-E1379.
36. Desmyter A., Spinelli S., Payan F., Lauwereys M., Wyns L., Muyldermans S., Cambillau C. Three camelid VHH domains in complex with porcine pancreatic β -amylase: Inhibition and versatility of binding topology. *J. Biol. Chem.*, 2002, Vol. 277, no. 26, pp. 23645-23650.
37. Desmyter A., Transue T. R., Ghahroudi M. A., Thi M. H., Poortmans F., Hamers R., Muyldermans S., Wyns L. Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme. *Nat. Struct. Biol.*, 1996, Vol. 3, no. 9, pp. 803-811.
38. Ding X., Boney-montoya J., Owen B.M., Bookout A.L., Coate C., Mangelsdorf D.J., Kliewer S.A. Nanobody-coupled microbubbles as novel molecular tracer. *J. Control Release*, 2012, Vol. 158, no. 2, pp. 346-353.
39. Dolk E., van der Vaart M., Hulsik D.L., Vriend G., de Haard H., Spinelli S., Cambillau C., Frenken L., Verrips T. Isolation of llama antibody fragments for prevention of dandruff by phage display in shampoo. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005, Vol. 71, no. 1, pp. 442-450.
40. Dudgeon K., Famm K., Christ D. Sequence determinants of protein aggregation in human VH domains. *Protein Eng. Des. Sel.*, 2009, Vol. 22, no. 3, pp. 217-220.

41. Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V.V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S., Tillib S.V., Nedospasov S.A. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2016, Vol. 113, no. 11, pp. 3006-3011.
42. Evazalipour M., D'Huyvetter M., Tehrani B.S., Abolhassani M., Omidfar K., Abdoli S., Arezumand R., Morovvati H., Lahoutte T., Muyldermans S., Devoogdt N. Generation and characterization of nanobodies targeting PSMA for molecular imaging of prostate cancer. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2014, Vol. 9, no. 3, pp. 211-220.
43. Ewert S., Cambillau C., Conrath K., Plückthun A. Biophysical properties of camelid VHH domains compared to those of human VH3 domains. *Biochemistry. American Chemical Society*, 2002, Vol. 41, no. 11, pp. 3628-3636.
44. Flajnik M.F., Deschacht N., Muyldermans S. A case of convergence: Why did a simple alternative to canonical antibodies arise in Sharks and Camels? *PLoS Biol.*, 2011, Vol. 9, no. 8, p. e1001120.
45. Freeman E.E., Weiss H.A., Glynn J.R., Cross P.L., Whitworth J.A., Hayes R.J. Herpes simplex virus 2 infection increases HIV acquisition in men and women: systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. *AIDS. England*, 2006, Vol. 20, no. 1, pp. 73-83.
46. Frenken L.G., van der Linden R.H., Hermans P.W.J., Bos J.W., Ruuls R.C., de Geus B., Verrips C.T. Isolation of antigen specific llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biotechnol.*, 2000, Vol. 78, no. 1, pp. 11-21.
47. Gainkam L.O.T., Huang L., Cavelliers V., Keyaerts M., Hernot S., Vaneycken I., Vanhove C., Revets H., de Baetselier P., Lahoutte T. Comparison of the biodistribution and tumor targeting of two ^{99m}Tc-labeled anti-EGFR nanobodies in mice, using pinhole SPECT/micro-CT. *J. Nucl. Med.* 2008. Vol. 49, no. 5. pp. 788-795.
48. Gainkam T.L.O., Cavelliers V., Devoogdt N., Vanhove C., Xavier C., Boerman O., Muyldermans S., Bossuyt A., Lahoutte T. Localization, mechanism and reduction of renal retention of technetium-99m labeled epidermal growth factor receptor-specific nanobody in mice. *Contrast Media Mol. Imaging*, 2011, Vol. 6, no. 2, pp. 85-92.
49. Gasser M., Waaga-Gasser A.M. Therapeutic Antibodies in Cancer Therapy. *Adv. Exp. Med. Biol. United States*, 2016, Vol. 917, pp. 95-120.
50. Gennigens C., Collignon J., Jerusalem G., Rorive A., Sautois B. Therapeutic monoclonal antibodies in hematocology. *Rev Med Liege*, 2009, Vol. 64, no. 5-6, pp. 264-267.
51. Geoghegan E.M., Zhang H., Desai P.J., Biragyn A., Markham R.B. Antiviral activity of a single-domain antibody immunotoxin binding to glycoprotein D of herpes simplex virus 2. *Antimicrob. Agents Chemother*, 2015, Vol. 59, no. 1, pp. 527-535.
52. Gherardi E., Birchmeier W., Birchmeier C., Woude G. Vande. Targeting MET in cancer: rationale and progress. *Nat. Rev. Cancer. Nature Publishing Group*, 2012, Vol. 12, no. 2, pp. 89-103.
53. Greenberg A.S., Avila D., Hughes M., Hughes A., McKinney E.C., Flajnik M.F. A new antigen receptor gene family that undergoes rearrangement and extensive somatic diversification in sharks. *Nature*, 1995, Vol. 374, no. 6518, pp. 168-173.
54. Hafian H., Sukhanova A., Turini M., Chames P., Baty D., Pluot M., Cohen J.H.M., Nabiev I., Millot J.M. Multiphoton imaging of tumor biomarkers with conjugates of single-domain antibodies and quantum dots. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2014, Vol. 10, no. 8, pp. 1701-1709.
55. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. Naturally occurring antibodies devoid of light chains. *Nature*, 1993, Vol. 363, no. 6428, pp. 446-448.
56. Harmsen M.M., de Haard H.J. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 2007, Vol. 77, no. 1, pp. 13-22.
57. Harmsen M.M., Fijten H.P.D., Engel B., Dekker A., Eblé P.L. Passive immunization with llama single-domain antibody fragments reduces foot-and-mouth disease transmission between pigs. *Vaccine*, 2009, Vol. 27, no. 13, pp. 1904-1911.
58. Harmsen M.M., van Solt C.B., van Zijderveld-Van Bommel A.M., Niewold T.A., van Zijderveld F.G. Selection and optimization of proteolytically stable llama single-domain antibody fragments for oral immunotherapy. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, Vol. 72, no. 3, pp. 544-551.
59. Hassanzadeh-Ghassabeh G., Devoogdt N., de Pauw P., Vincke C., Muyldermans S. Nanobodies and their potential applications. *Nanomedicine*, 2013, Vol. 8, no. 6, pp. 1013-1026.
60. Helma J., Cardoso M. C., Muyldermans S., Leonhardt H. Nanobodies and recombinant binders in cell biology. *J. Cell Biol*, 2015, Vol. 209, no. 5, pp. 633-644.
61. Herrera C., Tremblay J.M., Shoemaker C.B., Mantis N.J. Mechanisms of ricin toxin neutralization revealed through engineered homodimeric and heterodimeric camelid antibodies. *J. Biol. Chem. United States*, 2015, Vol. 290, no. 46, pp. 27880-27889.
62. Heukers R., van Bergen en Henegouwen P.M.P., Oliveira S. Nanobody-photosensitizer conjugates for targeted photodynamic therapy. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2014, Vol. 10, no. 7, pp. 1441-1451.
63. Hmila I., Abdallah R.B.A.-B., Saerens D., Benlasfar Z., Conrath K., Ayeb M.E., Muyldermans S., Bouhaouala-Zahar B. VHH, bivalent domains and chimeric Heavy chain-only antibodies with high neutralizing efficacy for scorpion toxin AahI. *Mol. Immunol. England*, 2008, Vol. 45, no. 14, pp. 3847-3856.
64. Hmila I., Cosyns B., Tounsi H., Roosens B., Cavelliers V., Abderrazek R. Ben, Boubaker S., Muyldermans S., Ayeb M.E., Bouhaouala-Zahar B., Lahoutte T. Pre-clinical studies of toxin-specific Nanobodies: Evidence of *in vivo* efficacy to prevent fatal disturbances provoked by scorpion envenoming. *Toxicol. Appl. Pharmacol. Elsevier Inc.*, 2012, Vol. 264, no. 2, pp. 222-231.
65. Hoefman S., Ottevaere I., Baumeister J., Sargentini-Maier M. Pre-clinical intravenous serum pharmacokinetics of albumin binding and non-half-life extended Nanobodies. *Antibodies*, 2015, Vol. 4, no. 3, pp. 141-156.
66. Hudson P.J., Souriau C. Engineered antibodies. *Nat. Med.*, 2003, Vol. 9, no. 1, pp. 129-134.
67. Hultberg A., Temperton N.J., Rosseels V., Koenders M., Gonzalez-Pajuelo M., Schepens B., Ibañez L.I., Vanlandschoot P., Schillemans J., Saunders M., Weiss R.A., Saelens X., Melero J.A., Verrips C.T., Van Gucht S., De Haard H.J. Llama-derived single domain antibodies to build multivalent, superpotent and broadened neutralizing anti-viral molecules. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 4, p. e17665.

68. Hultberg A., Tremblay D. M., de Haard H., Verrips T., Moineau S., Hammarstrom L., Marcotte H. Lactobacilli expressing llama VHH fragments neutralise Lactococcus phage. *BMC Biotechnol.*, 2007, Vol. 7, no. 58, pp. 7-58.
69. Ibañez L. I., de Filette M., Hultberg A., Verrips T., Temperton N., Weiss R.A., Vandevelde W., Schepens B., Vanlandschoot P., Saelens X. Nanobodies with *in vitro* neutralizing activity protect mice against H5N1 influenza virus infection. *J. Infect. Dis.*, 2011, Vol. 203, no. 8, pp. 1063-1072.
70. Jähnichen S., Blanchetot C., Maussang D., Gonzalez-Pajuelo M., Chow K.Y., Bosch L., de Vrieze S., Serruys B., Ulrichs H., Vandevelde W., Saunders M., de Haard H.J., Schols D., Leurs R., Vanlandschoot P., Verrips T., Smit M.J. CXCR4 nanobodies (VHH-based single variable domains) potently inhibit chemotaxis and HIV-1 replication and mobilize stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, no. 47, pp. 20565-20570.
71. Kandalaf H., Hussack G., Aubry A., van Faassen H., Guan Y., Arbabi-Ghahroudi M., MacKenzie R., Logan S.M., Tanha J. Targeting surface-layer proteins with single-domain antibodies: a potential therapeutic approach against *Clostridium difficile*-associated disease. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2015, Vol. 99, no. 20, pp. 8549-8562.
72. Kijanka M., Dorresteyn B., Oliveira S., van Bergen en Henegouwen P.M.P. Nanobody-based cancer therapy of solid tumors. *Nanomedicine*, 2015, Vol. 10, no. 1, pp. 161-174.
73. Kijanka M., Warnders F.J., El Khattabi M., Lub-De Hooge M., van Dam G.M., Ntziachristos V., De Vries L., Oliveira S., van Bergen En Henegouwen P.M.P. Rapid optical imaging of human breast tumour xenografts using anti-HER2 VHHs site-directly conjugated to IRDye 800CW for image-guided surgery. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*, 2013, Vol. 40, no. 11, pp. 1718-1729.
74. Kirchhofer A., Helma J., Schmidthals K., Frauer C., Cui S., Karcher A., Pellis M., Muyldermans S., Casas-Delucchi C.S., Cardoso M.C., Leonhardt H., Hopfner K.-P., Rothbauer U. Modulation of protein properties in living cells using nanobodies. *Nat. Struct. Mol. Biol. Nature Publishing Group*, 2010, Vol. 17, no. 1, pp. 133-138.
75. Kratz F., Elsadek B. Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J. Control. Release. Netherlands*, 2012, Vol. 161, no. 2, pp. 429-445.
76. Lafaye P., Achour I., England P., Duyckaerts C., Rougeon F. Single-domain antibodies recognize selectively small oligomeric forms of amyloid beta, prevent Abeta-induced neurotoxicity and inhibit fibril formation. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 46, no. 4, pp. 695-704.
77. Li A., Xing J., Li L., Zhou C., Dong B., He P., Li Q., Wang Z. A single-domain antibody-linked Fab bispecific antibody Her2-S-Fab has potent cytotoxicity against Her2-expressing tumor cells. *AMB Express*, 2016, Vol. 6, no. 1, p. 32.
78. Maier J., Traenkle B., Rothbauer U. Real-time analysis of epithelial-mesenchymal transition using fluorescent single-domain antibodies. *Sci. Rep. Nature Publishing Group*, 2015, Vol. 5, p. 13402.
79. Maussang D., Mujić-Delić A., Descamps F.J., Stortelers C., Vanlandschoot P., Stigter-van Walsum M., Vischer H.F., van Roy M., Vosjan M., Gonzalez-Pajuelo M., van Dongen G.A.M.S., Merchiers P., van Rompaey P. Llama-derived single variable domains (nanobodies) directed against chemokine receptor CXCR7 reduce head and neck cancer cell growth *in vivo*. *J. Biol. Chem., USA*, 2013, Vol. 288, no. 41, pp. 29562-29572.
80. McCoy L.E., Gropelli E., Blanchetot C., Haard H.D., Verrips T., Rutten L., Weiss R.A., Jolly C. Neutralisation of HIV-1 cell-cell spread by human and llama antibodies. *Retrovirology*, 2014, Vol. 11, no. 83, pp. 1-15.
81. Miao Z., Luker K.E., Summers B.C., Berahovich R., Bhojani M.S., Rehemtulla A., Kleer C.G., Essner J.J., Nasevicius A., Luker G.D., Howard M.C., Schall T.J. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth *in vivo* and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 40, pp. 15735-15740.
82. Moutel S., Perez F. Utilisation des intrabodies: de l'étude des protéines intracellulaires à l'immunisation thérapeutique. *Medecine/Sciences*, 2009, Vol. 25, pp. 1173-1176.
83. Movahedi K., Schoonooghe S., Laoui D., Houbracken I., Waelpuut W., Breckpot K., Bouwens L., Lahoutte T., de Baetselier P., Raes G., Devoogdt N., van Ginderachter J.A. Nanobody-based targeting of the macrophage mannose receptor for effective *in vivo* imaging of tumor-associated macrophages. *Cancer Res.*, 2012, Vol. 72, no. 16, pp. 4165-4177.
84. Mujić-Delić A., de Wit R.H., Verkaar F., Smit M.J. GPCR-targeting nanobodies: Attractive research tools, diagnostics, and therapeutics. *Trends Pharmacol. Sci.*, 2014, Vol. 35, no. 5, pp. 247-255.
85. Muyldermans S. Nanobodies: natural single-domain antibodies. *Annu. Rev. Biochem.*, 2013, Vol. 82, pp. 775-797.
86. Olichon A., Surrey T. Selection of genetically encoded fluorescent single domain antibodies engineered for efficient expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*, 2007, Vol. 282, no. 50, pp. 36314-36320.
87. Pant N., Hultberg A., Zhao Y., Svensson L., Pan-Hammarstrom Q., Johansen K., Pouwels P.H., Ruggeri F.M., Hermans P., Frenken L., Boren T., Marcotte H., Hammarstrom L. Lactobacilli expressing variable domain of llama heavy-chain antibody fragments (lactobodies) confer protection against rotavirus-induced diarrhea. *J. Infect. Dis.*, 2006, Vol. 194, no. 11, pp. 1580-1588.
88. Panza P., Maier J., Schmees C., Rothbauer U., Söllner C. Live imaging of endogenous protein dynamics in zebrafish using chromobodies. Development. *The Company of Biologists*, 2015, Vol. 142, no. 10, pp. 1879-1884.
89. Peyvandi F., Scully M., Kremer Hovinga J.A., Cataland S., Knöb P., Wu H., Artoni A., Westwood J.-P., Mansouri Taleghani M., Jilma B., Callewaert F., Ulrichs H., Duby C., Tersago D. Caplacizumab for acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 374, no. 6, pp. 511-522.
90. Platonova E., Winterflood C.M., Junemann A., Albrecht D., Faix J., Ewers, H. Single-molecule microscopy of molecules tagged with GFP or RFP derivatives in mammalian cells using nanobody binders. *Methods. Elsevier Inc.*, 2015, Vol. 88, pp. 89-97.
91. Power U.F., Stortelers C., Allosery K., Melero J.A. Generation and characterization of ALX-0171, a potent novel therapeutic nanobody for the treatment of respiratory syncytial virus infection. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2016, Vol. 60, no. 1, pp. 6-13.
92. Pruszyńska M., Koumariou E., Vaidyanathana G., Revetsc H., Devoogdt N., Lahoutte T., Zalutsky M.R. Targeting breast carcinoma with radioiodinated anti-HER2 Nanobody. *Nucl. Med. Biol.*, 2013, Vol. 40, no. 1, pp. 52-59.

93. Put S., Schoonooghe S., Devoogdt N., Schurgers E., Avau A., Mitera T., D'Huyvetter M., De Baetselier P., Raes G., Lahoutte T., Matthys P. SPECT imaging of joint inflammation with Nanobodies targeting the macrophage mannose receptor in a mouse model for rheumatoid arthritis. *J. Nucl. Med.*, 2013, Vol. 54, no. 5, pp. 807-814.
94. Pysz M.A., Gambhir S.S., Willmann J.K. Molecular imaging: current status and emerging strategies. *Clin. Radiol.*, 2010, Vol. 65, no. 7, pp. 500-516.
95. Rajabi-Memari H., Jalali-Javaran M., Rasaei M.J., Rahbarizadeh F., Forouzandeh-Moghadam M., Esmaili A. Expression and characterization of a recombinant single-domain monoclonal antibody against MUC1 mucin in tobacco plants. *Hybridoma (Larchmt). United States*, 2006, Vol. 25, no. 4, pp. 209-215.
96. Rakovich T.Y., Mahfoud O.K., Mohamed B.M., Prina-Mello A., Crosbie-Staunton K., van den Broeck T., de Kimpe L., Sukhanova A., Baty D., Rakovich A., Maier S.A., Alves F., Nauwelaers F., Nabiev I., Chames P., Volkov Y. Highly sensitive single domain antibody-quantum dot conjugates for detection of HER2 biomarker in lung and breast cancer cells. *ACS Nano. United States*, 2014, Vol. 8, no. 6, pp. 5682-5695.
97. Rashidian M., Keliher E.J., Bilate A.M., Duarte J.N., Wojtkiewicz G.R., Jacobsen J.T., D'Huyvetter Cragolini J., Swee L.K., Victoria G.D., Weissleder R., Ploegh H. L. Noninvasive imaging of immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 19, pp. 6146-6151.
98. Roovers R.C., Laeremans T., Huang L., De Taeve S., Verkleij A.J., Revets H., de Haard H.J., van Bergen En Henegouwen P.M.P. Efficient inhibition of EGFR signalling and of tumour growth by antagonistic anti-EGFR Nanobodies. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2007, Vol. 56, no. 3, pp. 303-317.
99. Rothbauer U., Zolghadr K., Tillib S., Nowak D., Schermelleh L., Gahl A., Backmann N., Conrath K., Muyldermans S., Cardoso C., Leonhardt H. Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies. *Nat. Meth.*, 2006, Vol. 3, no. 11, pp. 887-889.
100. Rutgers K.S., Nabuurs R.J.A., van den Berg S.A.A., Schenk G.J., Rotman M., Verrips C.T., van Duinen S.G., Maat-Schieman M.L., van Buchem M.A., de Boer A.G., van der Maarel S.M. Transmigration of beta amyloid specific heavy chain antibody fragments across the *in vitro* blood-brain barrier. *Neuroscience. Elsevier Inc.*, 2011, Vol. 190, pp. 37-42.
101. Sadeqzadeh E., Rahbarizadeh F., Ahmadvand D., Rasaei M.J., Parhamifar L., Moghimi S.M. Combined MUC1-specific nanobody-tagged PEG-polyethylenimine polyplex targeting and transcriptional targeting of tBid transgene for directed killing of MUC1 over-expressing tumour cells. *J. Control. Release. Elsevier B.V.*, 2011, Vol. 156, no. 1, pp. 89-95.
102. Saerens D., Muyldermans S. Single domain antibodies: methods and protocols. *Methods Mol. Biol.*, 2012, Vol. 911, pp. 277-286.
103. Sawyer L.A. Antibodies for the prevention and treatment of viral diseases. *Antiviral Res.*, 2000, Vol. 47, no. 2, pp. 57-77.
104. Schorpp K., Rothenaigner I., Maier J., Traenkle B., Rothbauer U., Hadian K. A multiplexed high-content screening approach using the chromobody technology to identify cell cycle modulators in living cells. *J. Biomol. Screen*, 2016, Vol. 1, no. 13.
105. Sherwood L.J., Osborn L.E., Carrion Jr.R., Patterson J.L., Hayhurst A. Rapid assembly of sensitive antigen-capture assays for Marburg virus, using *in vitro* selection of llama single-domain antibodies, at biosafety level 4. *J. Infect. Dis.*, 2007, Vol. 196, no. s2, pp. S213-S219.
106. Siontorou C.G. Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy. *Int. J. Nanomedicine*, 2013, Vol. 8, pp. 4215-4227.
107. Soukos N.S., Hamblin M.R., Keel S., Fabian R.L., Deutsch T.F., Hasan T. Epidermal growth factor receptor-targeted immunophotodiagnosis and photoimmunotherapy of oral precancer *in vivo*. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 11, pp. 4490-4496.
108. Spinelli S., Frenken L.G., Hermans P., Verrips T., Brown K., Tegoni M., Cambillau C. Camelid heavy-chain variable domains provide efficient combining sites to haptens. *Biochemistry. United States*, 2000, Vol. 39, no. 6, pp. 1217-1222.
109. Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Kisserli A., Tabary T., Reveil B., Millot J. M., Chames P., Baty D., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Cohen J.H.M., Nabiev I. Oriented conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: Toward a new generation of ultrasmall diagnostic nanoprobe. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med. Elsevier Inc.*, 2012, Vol. 8, no. 4, pp. 516-525.
110. Thys B., Saerens D., Schotte L., de Bleeser G., Muyldermans S., Hassanzadeh-Ghassabeh G., Rombaut B. A simple quantitative affinity capturing assay of poliovirus antigens and subviral particles by single-domain antibodies using magnetic beads. *J. Virol. Methods. Elsevier B.V.*, 2011, Vol. 173, no. 2, pp. 300-305.
111. Tillib S.V., Ivanova T.I., Vasilev L.A., Rutovska M.V., Saakyan S.A., Gribova I.Y., Tutykhina I.L., Sedova E.S., Lysenko A.A., Shmarov M.M., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L. Formatted single-domain antibodies can protect mice against infection with influenza virus (H5N2). *Antiviral Res.*, 2013, Vol. 97, no. 3, pp. 245-254.
112. Torres T., Romanelli M., Chiricozzi A. A revolutionary therapeutic approach for psoriasis: bispecific biological agents. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 2016, Vol. 25, Iss. 7.
113. Ullrichs H., Silence K., Schoolmeester A., de Jaegere P., Rossenu S., Roodt J., Priem S., Lauwereys M., Casteels P., van Bockstaele F., Verschueren, Stanssens K., Baumeister P., Holz J., Beate J. Antithrombotic drug candidate ALX-0081 shows superior preclinical efficacy and safety compared with currently marketed antiplatelet drugs. *Blood*, 2011, Vol. 118, no. 3, pp. 757-765.
114. Unger M., Eichhoff A. M., Schumacher L., Stryio M., Menzel S., Schwan C., Alzogaray V., Zylberman V., Seman M., Brandner J. Rohde H., Zhu K., Haag F. Mittrücker H.-W., Goldbaum F., Aktories K., Koch-Nolte F. Selection of nanobodies that block the enzymatic and cytotoxic activities of the binary Clostridium difficile toxin CDT. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, p. 7850.
115. van Bockstaele F., Holz J.-B., Revets H. The development of nanobodies for therapeutic applications. *Curr. Opin. Investig. Drugs. England*, 2009, Vol. 10, no. 11, pp. 1212-1224.
116. van der Vaart J.M., Pant N., Wolvers D., Bezemer S., Hermans P.W., Bellamy K., Sarker S.A., van der Logt C.P.E., Svensson L., Verrips C.T., Hammarstrom L., van Klinken B.J.W. Reduction in morbidity of rotavirus

induced diarrhoea in mice by yeast produced monovalent llama-derived antibody fragments. *Vaccine*, 2006, Vol. 24, no. 19, pp. 4130-4137.

117. van Driel P.B.A.A., Boonstra M.C., Slooter M.D., Heukers R., Stammes M.A., Snoeks T.J.A., de Bruijn H.S., van Diest P.J., Vahrmeijer A.L., van Bergen en Henegouwen P.M.P., van de Velde C.J.H., Löwik C.V.G.M., Robinson D.J., Oliveira S. EGFR targeted nanobody-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy in a pre-clinical model of head and neck cancer. *J. Control. Release*, 2016, Vol. 229, pp. 93-105.

118. van Driel P.B.A.A., van der Vorst J.R., Verbeek F.P.R., Oliveira S., Snoeks T.J.A., Keereweer S., Chan B., Boonstra M.C., Frangioni J.V., van Bergen en Henegouwen P.M.P., Vahrmeijer A.L., Lowik C.W.G.M. Intraoperative fluorescence delineation of head and neck cancer with a fluorescent Anti-epidermal growth factor receptor nanobody. *Int. J. Cancer*, 2014, Vol. 134, no. 11, pp. 2663-2673.

119. van Heeke G., Allosery K., de Brabandere V., de Smedt T., Detalle L., de Fougereolles A. Nanobodies* as inhaled biotherapeutics for lung diseases. *Pharmacol. Ther.*, 2016, JPT-06924.

120. van Roy M., Ververken C., Beirnaert E., Hoefman S., Kolkman J., Vierboom M., Breedveld E., 't Hart B., Poelmans S., Bontinck L., Hemeryck A., Jacobs S., Baumeister J., Ulrichs H. The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody* ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis. *Arthritis Research and Therapy*, 2015, Vol. 17, p. 135.

121. Vaneycken I., Devoogdt N., van Gassen N., Vincke C., Xavier C., Wernery U., Muyldermans S., Lahoutte T., Caveliers V. Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer. *FASEB J.*, 2011, Vol. 25, no. 7, pp. 2433-2446.

122. Vanlandschoot P., Stortelers C., Beirnaert E., Itatí L., Schepens B., Depla E., Saelens X. Nanobodies: New ammunition to battle viruses. *Antiviral Research*, 2011, Vol. 92, pp. 389-407.

123. Vercruysse T., Pardon E., Vanstreels E., Steyaert J., Daelemans D. An intrabody based on a llama single-domain antibody targeting the N-terminal α -helical multimerization domain of HIV-1 rev prevents viral production. *J. Biol. Chem. USA*, 2010, Vol. 285, no. 28, pp. 21768-21780.

124. Vosjan M.J., Vercammen J., Kolkman J.A., Stigter-van Walsum M., Revets H., van Dongen G.A. Nanobodies Targeting the hepatocyte growth factor: potential new drugs for molecular cancer therapy. *Mol. Cancer Ther.*, 2012, Vol. 11, no. 4, pp. 1017-1025.

125. Wesolowski J., Alzogaray V., Reyelt J., Unger M., Juarez K., Urrutia M., Cauerhff A., Danquah W., Rissiek B., Scheuplein F., Schwarz N., Adriouch S., Boyer O., Seman M., Licea A., Serreze D. V., Goldbaum F. A., Haag F., Koch-Nolte F. Single domain antibodies: Promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2009, Vol. 198, no. 3, pp. 157-174.

126. Yardehnavi N., Behdani M., Bagheri K.P., Mahmoodzadeh A., Khanahmad H., Shahbazzadeh D., Habibi-Anbouhi M., Ghassabeh G.H., Muyldermans S.A. Camelid antibody candidate for development of a therapeutic agent against Hemiscorpius lepturus envenomation. *FASEB J.*, 2014, Vol. 28, no. 9, pp. 4004-4014.

Авторы:

Горшкова Е.Н. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии центра молекулярной биологии и биомедицины института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Василенко Е.А. — аспирант, младший научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии центра молекулярной биологии и биомедицины института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Тиллиб С.В. — д.б.н., руководитель лаборатории молекулярных биотехнологий ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия

Астраханцева И.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии центра молекулярной биологии и биомедицины института биологии и биомедицины ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Authors:

Gorshkova E.N., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology, Department of Molecular Biology and Biomedicine, Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Vasilenko E.A., PhD Student, Junior Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology, Department of Molecular Biology and Biomedicine, Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Tillib S.V., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnologies, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Astrakhantseva I.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology, Department of Molecular Biology and Biomedicine, Institute of Biology and Biomedicine, N.I. Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Поступила 24.08.2016
Принята к печати 31.08.2016

Received 24.08.2016
Accepted 31.08.2016

РОЛЬ РАЗЛИЧНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ CD4⁺T-ЛИМФОЦИТОВ ПРИ БЕРЕМЕННОСТИ

Соколов Д.И., Степанова О.И., Сельков С.А.

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им Д.О. Отта»,
Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Важную роль в формировании иммунологической толерантности при беременности играют Т-лимфоциты. В настоящем обзоре рассматривается характеристика Т-лимфоцитов децидуальной оболочки и плаценты, особенности их миграции и функциональной активности при беременности. В обзоре обсуждается роль субпопуляций Th1-, Th17-, Th2- и Treg-лимфоцитов в формировании плаценты и иммунорегуляции беременности, а также их взаимодействие с клетками децидуальной оболочки и трофобласта.

Ключевые слова: беременность, плацента, лимфоциты, трофобласт, децидуальная оболочка

THE ROLE OF THE DIFFERENT SUBPOPULATIONS OF CD4⁺T LYMPHOCYTES DURING PREGNANCY

Sokolov D.I., Stepanova O.I., Selkov S.I.

D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. An important role in the formation of immunological tolerance during pregnancy play T lymphocytes. In the present review discusses the characteristics of T lymphocytes, decidua and placenta, especially their migration and functional activity during pregnancy. The review discusses the role of the subpopulations of Th1, Th17, Th2 and Treg lymphocytes in the formation of the placenta and the immune regulation of pregnancy, as well as their interaction with the cells of the decidua and trophoblast.

Keywords: pregnancy, placenta, lymphocytes, trophoblast, decidua

Introduction

Pregnancy is an example of the unique cooperation between the maternal and the semi-allogenic fetus organism. During pregnancy an adaptation to fetus development and securing of maternal organism, first of all her immune system, occurs. An important aspect of maternal immune response transformation is a formation of immune tolerance, in development of which decidua macrophages [3], T lymphocytes,

and NK cells play a significant role. T lymphocytes take an active part in preparing endometrium for blastocyst implantation and forming favorable microenvironment, as well as further development of the placenta, fetal membranes, and fetus, and they maintain fetus vitality [13]. The most distinct changes of immune system population cell composition at pregnancy is observed in the zone of the uteroplacental bed, where endometrium

Адрес для переписки:

Соколов Дмитрий Игоревич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
акушерства, гинекологии и репродуктологии
им Д.О. Отта»
199034, Россия, Санкт-Петербург,
Менделеевская линия, 3.
Тел.: 8 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Address for correspondence:

Sokolov Dmitry I.
D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology
and Reproductology
199034, Russian Federation, St. Petersburg,
Mendeleevskaya line, 3.
Phone: 7 (812) 323-75-45, 328-98-50.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.И. Соколов, О.И. Степанова, С.А. Сельков «Роль
различных субпопуляций CD4⁺T-лимфоцитов
при беременности» // Медицинская иммунология, 2016.
Т. 18, № 6. С. 521-536.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-521-536
© Соколов Д.И. и соавт., 2016

For citation:

D.I. Sokolov, O.I. Stepanova, S.I. Selkov "The role of
the different subpopulations of CD4⁺T lymphocytes during
pregnancy", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 521-536.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-521-536
DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-521-536

leucocytes contact with trophoblast cells. Currently, in addition to well-known T lymphocyte populations Th1 and Th2, the following subpopulations are pointed out: T regulatory (Treg), Th17, follicular T helpers (Tfh), Th9, and Th22. Moreover, T cells, combining secretion of cytokines, which are typical for different subpopulations, are distinguished [139]. A theory of the pivotal role of Th1/Th2 paradigm in formation of immune tolerance with respect to semi-allogenic fetus, which was popular for a long period of time, currently fails to satisfy most of researchers, who actively study reproductive process immunology. Thus, a classical scheme, based on balanced immune response, mostly controlled by Th2 lymphocytes, has been completed now with information about the role of Treg and Th17 subpopulations.

T cell subpopulation: differentiation and plasticity of inter-population transitions

At the moment among CD4⁺T lymphocytes a lot of subpopulations are distinguished, based on the spectrum of cytokines secreted by them and their expression of certain transcription factors (Figure 1, see Cover, p. 2) [45, 101]. In this review, the functions of four subpopulations (Th1, Th2, Th17 and Treg), are considered. The role of which, according to modern ideas, during physiological pregnancy is leading.

Th1 lymphocyte subpopulation is characterized by secretion of pro-inflammatory cytokines, including IL-2, IL-15, TNF α , IFN γ , and controls cellular immune response realization [89]. Th1 lymphocytes express Tbet transcription factor and receptors CXCR3 [97], CCR6 [106], IL-18R [137] CCR5 [91], and some other (Table 1).

Th2 lymphocyte subpopulation is characterized by secretion of anti-inflammatory cytokines IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, and controls humoral

immune response realization. Th2 lymphocytes express transcription factor Gata3 and receptors CD294 [54], CCR3, CCR4, CCR8, CRTH2, CD62L, CD30 (Table 1) [106]. At that, it should be specified that cytokine division into pro- and anti-inflammatory is relative, and often the same cytokines occasionally have both pro- and anti-inflammatory activity, depending on a situation, such as IL-6 and IL-4.

Differentiation of certain Th lymphocyte subpopulations is controlled by cytokines, secreted by various microenvironment cells, including antigen-presenting cells (Figure 1). Th1 lymphocytes are differentiated from naive Th0 lymphocytes in the presence of IL-12 (STAT4 signal path), which is accompanied by an increase of T-bet transcription factor expression [101, 114]. IL-33 cytokine, being a transcription factor, secreted by macrophages, dendritic cells (DC), and epithelial cells, in the presence of IL-2 stimulates Th1 differentiation and their IFN γ secretion [50]. It has been determined, that IL-18 combined with IL-12 increases secretion of IFN γ by Th1 cells [137]. TGF- β inhibits IFN γ -mediated differentiation, proliferation, and secretion of cytokines by Th1 cells [40, 86, 121]. Recently, an alternative method of Th1 differentiation, constituting an action of cytokine IL-4, TGF- β , and IFN γ totality on naive T lymphocytes, has been described [126]. Th1 lymphocytes, obtained in such a way, are distinguished by an expression of CD103, thus, the authors do separate them into CD103⁺Th1 cell subpopulation. The presence of NO or NO and IFN γ combination directs TGF- β -induced naive T cell differentiation in Th1 direction [57]. IL-4, IL-6 [26], transcription repressor Gfi1 [119] participate in inhibition of differentiation in Th1 direction.

TABLE 1. THE CHARACTERISTICS OF CD4⁺T LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS

T-lymphocyte subpopulation	Marker combinations, used for the identification of a population	Other surface molecules	Secreted cytokines
Th1	CD4, IL-18R [137], CCR5 [91]	CXCR3, CCR6 [106] CD26, membrane form IFN γ , LAG-3, CCR5, CXCR3 [1]	IL-2, IL-15, TNF α , IFN γ
Th2	CD4, CD294 [54]	CCR3, CCR4, CRTH2 [106], CD62L, CD30, CCR8 [1], CD103 [126]	IL-4, IL-5, IL-6, IL-13
Th17	CD4, CCR6, CD161 [7, 23], ROR γ t [106, 111], CD26 [11]	ROR α t, IL-23R, IL-12R, [7], CCR2, CXCR3, CCR5, CXCR6, CCR4, CD62L, CCR7, CXCR4, CXCR5 [46]	IL-17A, IL-22, IL-21, IL-17F, IL-26 [87, 89], TNF α , limphotoxin- β [7, 101, 106]
Treg	CD4, CD25, Foxp3, CD127 ^{low} [56, 66], CTLA-4 (intercellular) [49], CD4 ⁺ CD25 ^{high} CD62L ^{high} [10, 56], FoxP3, neuropilin-1 [141]	GATA3, CD28 [122], CD45RO, CD45RB, CD45RA, CD44, integrin α 4 β 7, CTLA-4, CCR9, OX40, CCR7 и CD62L, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8, CCR9, CCR10, CXCR3, CXCR5, CXCR6	IL-10, TGF- β , IL-4, IL-5

Th2 lymphocyte pool is formed mostly in the presence of IL-4, IL-33 and absence of IL-12 [73, 102]. IL-1 [110], IL-6 [26] also take part in Th2 differentiation. Th2 differentiation is controlled by transcription factors STAT6, GATA3, c-maf [1]. Estradiol and progesterone, an increase of which is observed in peripheral blood during pregnancy, stimulate IL-10 DC secretion, facilitating Th2 differentiation [131]. Progesterone direct action on Th2 differentiation stimulation and Th1 differentiation inhibition [75] has been determined, which may be important for peripheral cell differentiation in view of high progesterone concentration in decidua. Decidua DCs express co-stimulatory molecules CD80, CD86, CD83 and secrete small amounts of IL-12, facilitating Th2 differentiation [76].

Th17 lymphocytes, through cytokine IL-17 secretion, cause secretion by target cells of wide pro-inflammatory cytokine spectrum. Th17 lymphocytes are characterized by expression of molecules ROR γ t (retinoic acid related orphan receptor γ t), IL-23R, CCR4, IL-12R, CD161 and high expression level of chemokine receptor CCR6 (Figure 1, Table 1) [7, 39, 97]. These cells secrete IL-17A, IL-17F, IL-22, IL-26, lymphotoxin- β [7, 101, 106], IL-21 [87, 89]; they produce TNF α in higher amounts than T cells of other populations, by means of which their participation in pathogenic processes is realized [19]. Th17 are involved in protecting the organism from bacteria, fungi and viruses; and participate in the pathogenesis of many autoimmune diseases [101]. It should be mentioned that this subpopulation combines the heterogeneous cell group, among which there are: 1) cells, producing IL-17, IL-22 and expressing CCR6 and ROR γ t; 2) cells with properties of both Th17 and Th1 lymphocytes, simultaneously producing IL-17 and IFN γ and expressing ROR- γ t and T-bet (they serve as a marker of IL-17 and IFN γ functionality, respectively); 3) highly-proliferative cell type, secreting at an early stage of differentiation either IL-17 in conjunction with IL-10, or IL-17 in conjunction with IFN γ [106]. For a short period of time (3-5 days after antigen stimulation) human Th17 produces significant amounts of IL-10, its secretion is stimulated under IL-23 and IL-27 action and inhibits in the presence of IL-1 β [106]. Naive T lymphocyte differentiation into Th17 depends on the type of pathogen, penetrated into an organism, and cytokines, secreted by antigen-presenting cell. Thus, it has been determined that DCs with CD103⁺CD11b⁺ phenotype, producing TNF α , IL-6, IL-12p40 and IL-23p19 after LPS stimulation, induce Th0 differentiation in the direction of Th17 cells. On the contrary, DCs with CD103⁺CD11b⁻ phenotype produce IL-10 and stimulate naive T lymphocyte differentiation into FoxP3⁺Treg (Figure 1) [46]. According to different data, soluble factors TGF- β ,

IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23, prostaglandin E2 in various combinations [1, 5, 7, 15, 23, 46, 59, 70, 71, 72, 88, 97, 102, 110, 114, 127] take part in Th17 differentiation. Other authors noted that TGF- β had no impact on Th17 differentiation and only weakly suppressed their proliferation [111]. According to different data, the action of TGF- β , combined with IL-1 β and IL-6, hampers [101], or *vice versa* facilitates [32, 102] Th17 differentiation. There is some information that small amount of TGF- β promotes Th17 differentiation, while large concentrations *vice versa* inhibit Th17 differentiation [106]. At that, compared to Th1 and Th2 subpopulations, Th17 has lower sensitivity to TGF- β inhibiting action [7]. Inhibiting of Th17 formation occurs in the presence of cytokines IL-2, IL-27, IL-4, and IFN γ [46, 59, 65]. Retinoic acid [20] and growth factor independent 1 (Gfi1) [41], progesterone (using STAT5 and STAT3 signal paths) [55], transcription factor Ets-1 [101] participate in Th17 and inducible Treg differentiation restriction through ROR γ t receptor. CD200R binding with its ligand CD200 (OX-2) [95] contributes to Th17 differentiation inhibiting, which may underlie effectiveness of lymphocyte vaccination at habitual non-carrying of pregnancy [2].

Currently much attention is paid on Treg lymphocyte subpopulation, as main immunoregulatory cells at pregnancy, which control immune tolerance formation in the mother-fetus system. It is assumed that in the decidua, the Tregs mainly fulfill immunosuppressive action [16]. Treg lymphocytes have anti-inflammatory and immunosuppressive effects [96], secrete IL-10, TGF- β , IL-4, IL-5 [32], express GATA3 (Figure 1, Table 1) [29]. Treg lymphocytes inhibit proliferation and production of cytokines by T cells, production of immunoglobulins by B-cells, cytotoxic activity of NK-cells, DC maturation, and, thus, contribute to tolerance formation [104]. Treg suppresses CD4⁺CD25⁻ T cell differentiation into Th1, involving intercellular contacts and TGF- β [115].

Treg cells include CD4⁺T lymphocytes, expressing CD25^{high} and able to have suppressive action on autoreactive T lymphocytes [140]. It should be noted that CD25 is not a molecule, necessary to realize Treg suppressive properties [109]. Treg is characterized by low CD127 expression, reduced CD4 (CD4^{dim}), CD45RB^{low/-} expression [78], CD28 expression [109], intracellular CTLA-4 (cytotoxic T lymphocyte antigen) expression [32]. CTLA-4 takes part in restriction of Treg proliferative activity, population homeostasis, and execution of their suppressive properties in respect of effector T lymphocytes [49, 109, 122]. CTLA-4 deletion results in T cell activation and systemic autoimmune reaction development [98, 104]. At Treg activation CTLA-4 expression increases [49]. CTLA-4 blocking has an effect on Treg that is similar to TGF- β blocking, and, moreover, it

stimulates superficial TGF- β Treg expression [109]. Maintenance of Treg proliferative activity occurs at CD28 binding with its ligand [109, 122]. Also these cells express FoxP3 transcription factor, required for realization of Treg cell suppressive properties [87].

By the differentiation nature there are Tregs, maturing in the thymus (tTreg or nTreg – naive), and Tregs, maturing at the periphery (pTreg or iTreg – induced). Naive Treg (nTreg) cells with CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ phenotype mature in the thymus [87]. nTreg subpopulation also expresses the following markers: CD45RO (memory cells, activated), CD45RB (quiescent cells), CD45RA⁺, CD25, CD44, integrin α 4 β 7 (quiescent cells), intracellular CTLA-4, CD28, chemokine receptors, CXCR4, CCR9 (quiescent cells), OX40 [87], Helios [32], as well as CCR7 and CD62L receptors, allowing them to migrate into lymphatic nodes [32]. In FoxP3 the structure that exists is conservative non-coding sequence 1 (CNS1), specific for induced Tregs (iTreg) [134]. Among iTreg there are 1 type Tregs (Tr1) and Th3 Tregs. Tr1 lymphocytes secrete IL-10, TGF- β , IL-2, IL-5, IFN γ [8, 85, 87]. These cells have suppressive action through IL-10 secretion [87]. There is no specific marker to mark this subpopulation, however, they are determined by GATA-3 (ROG) expression [87]. Suppressive action of this Treg subpopulation is less dependent from FoxP3 expression [10]. Treg Th3 subpopulation is characterized by TGF- β and IL-10 secretion and FoxP3 expression [87].

CD4⁺CD25⁺ alteration into Treg cells at the periphery (outside the thymus) occurs with obligatory B7 molecule co-stimulation [61], at activation through TcR [35] in cooperation with action of IL-10 and TGF- β cytokines [42, 109, 121], the source of which is the trophoblast in the zone of the uteroplacental bed [17, 29, 96, 120]. Estradiol promotes Treg differentiation and increases their proliferation in response to activation through CD3/CD28 [131]. There is also information about the necessity of IL-2 for Treg differentiation from cells with CD4⁺CD25⁺ phenotype [87, 131]. Participation of TRAIL molecule in stimulation of T cell differentiation into Treg cell population was also noted [120]. Main growth factor for Treg1 is IL-15 [87]. Furthermore, Treg1 cell (with FoxP3⁺ phenotype, producing IL-10) differentiation takes place with IL-27 and TGF- β action [9]. Treg Th3 is differentiated under TGF- β action from naive CD4⁺T cells [87]. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP – cytokine from IL-7 family), secreted by the trophoblast, stimulates Treg differentiation with suppressive properties and high level of TGF- β 1 and IL-10 secretion from CD4⁺CD25⁺T cells, however, this process requires TGF- β presence [29]. To realize the TGF- β -induced FoxP3 expression stimulation, accompanying peripheral Treg differentiation, the

CNS1 sequence is required [107]. CNS1 deletion causes both Treg level reduction (and as a consequence, increased risk of spontaneous abortions), and coiled artery dyspoiesis and reduction of placenta vessel thickness that morphologically corresponds to pathologic inflammation [107]. Progesterone stimulates CD4⁺ naive cell differentiation from the bone marrow into Tregs, predominantly the memory cells (with CD45RA⁺CD45RO⁺ phenotype) [55]. Naive Treg cells are distinguished by CD45RA⁺CD45RO⁺CD31⁺ phenotype, and memory cells by CD45RA⁺CD45RO⁺CD31⁺ phenotype [32]. While activating Tregs obtain CD45RO phenotype [32], the suppression of T lymphocyte differentiation in Treg direction takes place with IL-6 [55], NO and IFN γ participation [57].

In the mouse model it has been demonstrated that Th1-population activation can block differentiation of Tregs, specific for fetus antigens, and can promote spontaneous abortion development [136]. T cell differentiation occurs with close interaction with DC. In the beginning of pregnancy the DC concentration in endometrium is higher compared to non-pregnant women, or women at terminal pregnancy stages [51], at that, a lot of immature DCs are observed [44, 51]. Immature maternal DCs through reduced activity of ICAM-1/LFA-1 interaction, IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase) expression, and IL-10 secretion, contribute to peripheral Treg development [109, 131]. Also, immature DCs promote Th2 cytokine secretion [131]. IDO molecule, besides stimulation of Treg differentiation, plays also an important role in DC auto-regulation, increasing their secretion of IL-10 and TGF- β [131], as well as in suppression of NK-cell cytotoxic activity.

HLA-DR is a parameter for Treg division into subpopulations with various mechanisms of suppressive action and, probably, reflects Treg maturity degree. A group of terminally differentiated effector cells, expressing HLA-DR, has rapid suppressive effect exclusively through contact interaction of CD39 and ICOS (inducible T cell co-stimulator) molecules. This molecule expression reflects an intensity of suppressive cell activity. HLA-DR negative cells demonstrate a delayed suppressive effect through contact interaction and secretion of IL-4 and IL-10 [10].

For CD4⁺ lymphocytes a certain plasticity of interpopulation transfers of T cells was described. Th1 and Th2 populations are considered to be quite stable, while in Th17 and Treg populations high instability and plasticity is observed. IL-2 can both stimulate Th1 differentiation and suppress Th17 and Treg differentiation, and alter already differentiated iTreg profile, thus, changing lineage, established with TGF- β [91]. It is believed that Treg and Th17 originate from common progenitor, and TGF- β concentration defines T cell lineage: its low

concentrations play an important role in autocrine maintenance of Th17 population differentiation, while TGF- β high concentrations facilitate progenitor-cell differentiation into Treg (Figure 1) [101]. A possibility to differentiate Th17 into Th1 under IL-12, IL-23 action was demonstrated [7, 89, 102, 106]. It has been determined that naive Th0-cells with IL-1 β and IL-23 are differentiated into Th17; IL-12 introduction into this system directs Th0 differentiation into Th1 [23]. A possibility of Treg transformation into Th17 with IL-1 β and IL-2 was noted. In the mouse model the Treg cell differentiation into Th2 and Th1 was shown [32]. Th1 can differentiate into Th17 with cytokine IL-1 β /IL-6/IL-23, TGF- β /IL-6, or TGF- β /IL-6/IL-23 combinations; Th17 transfer to Th1 with IL-12/IL-23, TGF- β /IL-6 [64]. With interaction through surface molecule B7-H1 Th1 differentiation into Treg is carried out [6]. In the presence of IL-4 Th17-lymphocyte a differentiation shift in the direction of Th17/Th2 subpopulation, secreting IL-17A and IL-4 (Th17/Th2), as well as IL-5, IL-13, IL-21 and IL-22, and promoting IgE secretion *in vitro*, is observed [68]. In the *in vitro* conditions a possibility of Th2 reprogramming with IFN α , IFN β , and IL-12 into a hybrid of Th1 and Th2 cells (GATA-3⁺T-bet⁺), producing both Th2-cytokines and IFN γ , was demonstrated [37]. The population of cells, simultaneously producing IL-17 and IL-4, can be formed by the stimulation of the Th17 subpopulation, containing CCR6⁺CD161⁺ cells, in the presence of IL-4 [58]. And combined action of IFN γ and IL-12 cytokines induces Th17 cell differentiation into Th1/Th17 cell subpopulation [58].

Thus, the main differentiation paths of Th lymphocytes with antigen-presenting cells are now well defined. Alternative differentiation paths are also established, as well as possibilities of interpopulation Th lymphocyte transfers, controlled by cytokines and microenvironment cells. The presence of Th lymphocytes and antigen-presenting cells in the zone of the uteroplacental bed [3], a unique microenvironment, and the presence of most cytokines, participating in Th lymphocyte differentiation control, in this zone, and the presence of lymph vessels in the endometrium and uterine lymph nodes may show evidence of a certain effect of placenta and decidua cells on Th lymphocyte differentiation path at pregnancy.

Localization of T lymphocyte subpopulations at pregnancy

It has been shown in the mouse model that during pregnancy the spleen T and B cells actively proliferate, and an activeness of their apoptosis does not increase [84], which can indicate lack of immunity suppression during pregnancy. In the endometrium of women at early stages of pregnancy a lower T cell count is found compared to non-pregnant women [129].

T cells make up 10-20% of leucocytes in decidua [82, 89]. 25-45% of them are CD4⁺T lymphocytes, and 45-75% are CD8⁺T cells [82, 89, 132, 133]. T lymphocyte pool in the first trimester constitutes 10% of total decidua lymphocyte count, and 17% in the second trimester of pregnancy [51]. Pregnancy development is accompanied by increase of CD4⁺T lymphocyte amount in decidua [51, 89]. It has been shown in mouse models that the main pool of T cells is situated inside vessels, and the question about their functional activity in the decidua remain undetermined [82].

Literature data about T cell subpopulation content alteration in peripheral blood, as well as placenta and decidua, depending on pregnancy term are contradictory [48]. Th1-lymphocyte domination in the proliferative phase of the menstrual cycle was established [103]. In the first trimester Th1 (CCR4⁺CXCR3⁺CCR6⁻ phenotype) make up 5-30% of decidua cells, Th2 – 2% [89]. According to some authors' data, Th1 and Th2 cell count in peripheral blood has no changes during the whole pregnancy, and has no variations from their count in the group of non-pregnant women [62, 103]. It has also been noted that in the first trimester of pregnancy Th1 (with CCR6⁻ phenotype) content in the decidua is higher compared to their content in peripheral blood [77, 103], and *vice versa*, Th1 with CCR6⁺ phenotype content is higher in blood than in the decidua. Th2-lymphocyte content in the decidua is increased in the first trimester of pregnancy [103], however, other researchers do not confirm this data and evidence that Th2 count in peripheral blood and decidua has no difference [77].

Concerning Th17 cell count in the decidua and peripheral blood during pregnancy, there are also no concurrent views. According to some data, the Th17 cell count in pregnant women's peripheral blood increased compared to non-pregnant women, and was maximal at the first trimester, reducing in the second and third trimesters. At that, the Th17 cell pool did not exceed 1-2% of the total peripheral blood mononuclear cell count [62, 135]. Other researchers found no difference [81] or noted Th17 cell count reduction by pregnancy termination [101]. In the endometrium the Th17 cell count increases with the beginning of pregnancy [81, 101, 135]. In the first pregnancy trimester the Th17 pool constitutes 2% of decidua CD4⁺T cells [89]. The data on relative Th17 cell count in the decidua are conflicting: according to some information Th17 count in the decidua exceeds the one in peripheral blood [81, 101, 135], in line with other authors' data, Th17 count in blood was higher than in the decidua [77].

For Treg-lymphocyte phenotyping, multiple nonstandard monoclonal antibody kits against both surface markers and transcription factors are used, which can be the reason of a big difference in the results

of various researcher teams. It has been established that Tregs are located in the maternal part of placenta and are not found in fetal membranes [124]. The Treg pool is 5% of decidual CD4⁺T cells [82] though 14% of decidual CD4⁺T cells [38, 78, 85, 89, 104]. Treg subpopulation, according to different data, constitutes 2.5 [10] to 8% of blood CD4⁺T cells and up to 13-20% decidual CD4⁺T cells [35, 51, 112, 131]. Data on Treg count changes in the dynamics of the gestation course. Many authors showed that at pregnancy Treg (CD4⁺CD25⁺) count increased both in circulation [118], achieving its peak in the second trimester [52, 56, 112, 131], and in zone of uteroplacental contact [87, 96, 108, 125, 143]. In the mouse model it has been found that Tregs increase in lymph nodes at pregnancy [142]. According to other data, the Treg count in circulation has no alterations in pregnant women during the whole pregnancy compared to non-pregnant women [32]. According to some data the Treg count in the decidua has no changes from the first to the second trimester [51]. There is also information about Treg count reduction in circulation in pregnant women at the second trimester compared to non-pregnant women [78]. Such significant discrepancy of results may be caused by different cell phenotyping strategies.

In the mouse model it has been shown that Treg actively proliferate at the beginning of pregnancy and their count increases 10 times compared to non-pregnant animals, which is accompanied by CD44 expression increase [99]. Treg count growth is carried out through both FoxP3⁻ cell differentiation into FoxP3⁺ cells, and existing FoxP3⁺Treg proliferation [99]. A similar mechanism can be realized in pregnant women organisms. In Treg pool formation at pregnancy seminal antigen stimulation, noted already at early stages of pregnancy, plays an important role [52, 99]. By the time fertile age begins, thymus activity is reduced, and it is also suppressed by steroid hormones at pregnancy. Thus, Treg expansion during pregnancy is most likely connected with the maturing of these cells at the periphery [87]. At the same time, there is enough data in favor of active thymus participation in Treg maturing during pregnancy, along with the presence of thymus involution morphological changes [52]. At the consecutive pregnancy, Treg accumulation occurs faster than at the first, simultaneously, IFN γ CD4⁺ secretion by the cells is reduced, which indicates an existence of a functionally active memory Treg pool [99].

Thus, despite an inconsistency of data on various CD4⁺T lymphocyte subpopulation content in endometrium and decidua, their presence in the zone of the uteroplacental bed is incontestable, which, in turn, suggests an existence of definite control

mechanisms of their selective migration into the decidua.

T lymphocyte migration in zone of uteroplacental bed

In the third trimester of pregnancy T lymphocyte activation, shown in their increased expression of CD11a and CD49d adhesion molecules compared to T lymphocytes of non-pregnant women [69], is noted, which can promote T cell accumulation in the endometrium and decidua.

Before the beginning of pregnancy Th1 and cytotoxic T cell migration occurs, and in the beginning of pregnancy they remain in the decidua. Th1 are characterized by expression of receptors CCR5 and CXCR3 [105], CXCR4 [4]. It has been shown in the mouse model that with myometrium stromal cell differentiation into decidual stromal cells, their expression of genes, coding chemoattractants for Th1 cells, in particular, CXCL9, CXCL10, CXCL11 and CCL5, is disturbed [83]. It is thought that in this way Th1 cell population can avoid migration into the decidua, thus providing for favorable conditions for pregnancy development. Both excessive and insufficient Th1 activity results in implantation disorders. At that, a link, regulating Th1-dependent T cell response activity, probably is Treg cells, as mentioned before.

Th2 lymphocytes express CCR4, CCR8, and CRTh2, providing for homing of these cells [105, 128]. Active Th2-lymphocyte migration into the decidua is secured by trophoblast production and CCL17 stromal cells (CCR4 ligand) in the first trimester of pregnancy [32].

During pregnancy Th17-lymphocyte accumulation in the decidua is observed. Th1 migration is stimulated by decidual stromal cell secretory products, while trophoblast secretory products have no effect on the migration of these cells [135]. It is believed that this effect is caused by cytokine CCL2 action [135]. It has been shown in various models that Th17 migration is carried out with participation of CCR6, a receptor for CCL20 [39, 75, 92, 138]. Thus, in the inflammatory conditions, CCL20 produced by macrophages, stimulates Th17 migration [60].

Treg lymphocytes migrate into uterus lymph nodes before the implantation and proliferate there [77, 102]. It is thought that there is a control mechanism of Treg selective migration from peripheral blood into the uterus lymph nodes and decidua at the beginning of pregnancy through particular chemokine production by microenvironment cells. Thus, Treg selective migration into the uterus is facilitated by L-selectin expression by microenvironment cells and their secretion of chemokines CX3CL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL22, CCL17, CCL20, which interact with the respective receptors of Treg: CD62L, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR8,

CCR9, CCR10, CXCR3, CXCR5, CXCR6 [32, 52, 77, 102, 131]. Gonadotropin (hCG), secreted by trophoblast [52, 53, 102, 140], estrogen, and progesterone [52] also participate in Treg selective migration control.

Thus, the control mechanisms of Th lymphocyte migration into the uterus endometrium and decidua during pregnancy are currently described. It should be noted that widely different Th lymphocyte subpopulations are present in the decidua, which is probably required for induction and maintenance of immune tolerance in the mother-fetus system. Also, the presence of professional antigen-presenting cells, decidual macrophages and DCs, is described in the decidua. However, the question about a mechanism of one or another Th lymphocyte population accumulation in the decidua remains open. Is it a result of selective migration from peripheral blood, or an outcome of in situ differentiation with antigen-presenting cells and a unique cytokine and cell microenvironment?

Phenotypic and functional peculiarities of CD4⁺T lymphocytes at pregnancy

Significant part of researches in the sphere of T cell response at pregnancy was conducted in mouse models. It should be noted that Th1 and Th2-lymphocyte development in mouse and human is quite similar, while in respect of Th17 and Treg, their different phenotypic characteristics and differentiation and proliferation conditions are noted [114]. Thus, T cell immunity study in mouse models is important, however, it often requires checking in human cells, especially concerning Th17 and Treg.

Placenta and decidua T cells differ by their phenotype from circulating T cells. To realize and maintain pregnancy the decidua T cells secrete increased amounts of IL-4, IL-10, LIF and M-CSF, while peripheral blood cells have no alterations in their secretion profile [89]. This microenvironment effect can be mediated by progesterone action [89]. It has been considered for a long time that Th1 cytokines have negative effect on pregnancy development, however, now this opinion is not believed to be unambiguous. Proinflammatory cytokines IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-18 to a large degree expressed normally in the zone of blastocyst implantation in the decidua at early stages of pregnancy [14]. There are researches, indicating that exogenous IL-12 introduction have no detrimental action on pregnancy development, mother's, or fetus's condition at early stages [94]. Th2 cytokines IL-4 and IL-10 are necessary for the successful pregnancy in humans [25, 130]. IL-10 cytokine, besides stimulating Th2 cytokine secretion, promotes angiogenesis in placenta, increases trophoblast vitality [12]. According to different data, peripheral blood mononuclears secrete a lot of IL-4 at pregnancy compared to non-pregnant

women [107]. According to other data, the beginning of pregnancy is not followed by increased secretion of IL-4 by T lymphocytes [100].

The great majority of decidua T cells are activated by fetus antigens and have CD45RA⁻ or CD45RO⁺ phenotype [89]. Fetus immune protection is fulfilled through increased expression of B7-2 and/or CD28 by decidua T lymphocytes and reduced expression of CTLA-4 [44]. At early stages of pregnancy, there is no receptor for IL-2 (CD25) on endometrium T cells in women [13]. On decidua and peripheral T lymphocytes at pregnancy, a reduced expression of ζ -chain CD3 molecule and TcR/CD3-zeta chain is already found at day 14 after implantation [13, 31]. Identified dose-dependent reduction of TcR/CD3-zeta expression by T lymphocytes with blood serum of pregnant women and, to an even greater degree, in amniotic fluid [31, 123], may indicate action of placenta immunoregulatory factors that change this molecule expression. As CD3-zeta activation on lymphocytes promotes Th1-cytokine secretion, suppressing this molecule expression may contribute to immune tolerance formation. We failed to find literature data, indicating a specific alteration of Th1 and Th2 subpopulation phenotype or functions, connected with their presence in placenta or decidua.

Decidua Th17 cells have $\alpha\beta$ TCR⁺CD45RO⁺CCR7⁺CD161⁺ phenotype, while peripheral blood Th17 cells mostly do not express CD161 [135]. Also, Th17 identification can be carried out by CCR2⁺CCR5⁻ phenotype [113]. Increased Th17-cell count in decidua is noted in women with spontaneous abortions [67]. IL-17 participation in inflammation initiation during premature delivery was noted [43]. Th17 cell participation in infertility formation was observed, as well [56]. On the other hand, Th17 through active TNF α secretion promote Treg activation [19]. In the implantation zone and decidua, increased concentration of unique population of Th17/Th2-lymphocytes (normally quite small in human) compared to peripheral blood was noted [68]. These cells facilitate successful pregnancy development, while their lack results in implantation disorder [68].

In women with recurrent spontaneous abortions, an increased Th1 and Th17 lymphocyte levels and reduced Th2 content in peripheral blood were found [62, 68]. Probably, imbalance between Treg and Th17 can contribute to pregnancy loss or its severe gestational disorders. A lot of pregnancy pathologies, connected with immune tolerance disturbance, are accompanied by Treg dysfunction [29]. In accordance with modern ideas, Treg plays a dominate role in immune tolerance maintenance with respect to the semi-allogenic fetus [52, 107]. The most important is Treg cell presence in decidua during implantation at early stages of pregnancy, while in the middle and at the end of pregnancy Treg neutralization does not

result in pathology [116]. Peripherally differentiated Tregs (iTreg) are specific to paternal antigens, suppress IFN γ and IL-4 secretion by T cells [52, 142], have increased expression of Helios molecule [99]. Also, Tregs inhibit IL-2 production by lymphocytes, thus, reducing Th1 cytokine secretion [35].

Phenotype and functional activity of decidual Tregs differs from those of circulating Tregs. Decidual Tregs express CTLA-4, HLA-DR, CD69, and CD25, more intensively than peripheral CD4⁺CD25^{bright} Treg cells, as well as demonstrate higher suppressive activity compared to peripheral blood Tregs [38, 124]. At pregnancy peripheral blood Tregs are noted to have reduced FoxP3 expression, increased CD45RO expression (effector/memory cell marker), and reduced CD45RA expression (naive cell marker), which reflects higher degree of activation of these cells compared to Tregs in non-pregnant women [78]. These alterations may be induced by action of hormones, in particular, progesterone and estradiol [78].

nTreg cell subpopulation can have suppressive action on the following types of cells: CD4⁺T cells, DCs, CD8⁺T cells, NKT cells, NK cells, monocytes/macrophages, B cells, mast cells, basophils, eosinophils, osteoblasts [87, 112]. Treg lymphocytes have suppressive action on T cells and/or DCs because of the secretion of soluble factors, intercellular contacts, and competition for growth factors. Soluble factors include production of IL-10, PD-1, TGF- β , LIF, FLG-2 (fibrinogen-like protein-2) [19, 53], granzyme-A, granzyme-B and perforin (causes effector T cell apoptosis), adenosine (blocks effector T cell cycle and hampers DC maturing) [52]. Intercellular contacts include binding of galectin-1 (blocks cell cycle of effector T cells and DCs), CTLA-4 (reduces activity of antigen presentation on DC [96]), induction of IDO into DC or macrophages, which prevents T cell and NK cell activation; the binding of CD223 Treg cells with MHCII on DCs hampers their maturation and antigen presentation; the binding of neuropilin-1 reduces activity of antigen presentation. Tregs have suppressive action through the presence of TGF- β on their surface in bound state [17, 18, 80]. Also Tregs can serve as a trap for IL-2, creating its deficiency for other cells [87]. In the first trimester of pregnancy decidual Tregs stimulate trophoblast cell invasiveness, mediated by IL-10 action (at that, TGF- β secretion by Treg cells limits trophoblast invasion), as well as stimulate HLA-G expression by trophoblast, which promotes reduction of NK cell cytotoxicity [29]. Other authors point out that IL-10 has no effect on implantation and course of pregnancy [130]. It has been established that Tregs inhibit Th1 and Th2 cell activation through IL-10 and TGF- β secretion, as well as through contact interaction owing to CD223 molecules, neuropilin-1, and CTLA-4 [19]. Tregs suppress proliferation of both

Th1 and Th2 lymphocytes, however, through high expression of receptors for IL-4 and IL-9 and autocrine nature of these growth factor action, Th2 lymphocytes are less exposed to inhibiting Treg action [24]. It has also been found that Tregs stimulate Th17 differentiation from naive T cells [19].

It has been demonstrated in the mouse model that Treg introduction cancels the risk of abortion, but, with that, it has no effect on Th1 secretion of cytokines (IFN γ and TNF α), and only slightly increases Th2 production of cytokines (IL-4, IL-10) by decidual lymphocytes [141], but then it significantly stimulates TGF- β and LIF production by decidual and trophoblast cells [141].

Thus, Tregs form microenvironment in zone of uteroplacental bed, promoting immune tolerance formation with respect to the fetus. Currently, a theory of balanced interaction of various Th subpopulations, among which the best-understood are Th1, Th2, Th17, and Treg, in the zone of the uteroplacental bed and regional lymph nodes is prevalent. Active interaction of these subpopulations may underlie a multilevel control of immune tolerance maintenance in the mother-fetus system, which is based on duplication of functions and multiple direct and reverse relations. A relatively new mechanism of immune tolerance formation through reciprocal transplacental migration of Tregs and their colonization of lymph nodes, which was named maternal-fetal microchimerism, should be taken into account [27, 30, 47]. It also should be noted that localized in the decidua and regional lymph nodes the immune system cells are also under active effect of trophoblast and decidua stroma cells.

Impact of placenta and decidua cells on T lymphocyte functional state

Decidua cells secrete molecules, regulating subpopulation content and functional activity of T lymphocytes. For example, galectin-1 is a protein of the endogenic glycan-binding protein family, an expression of which by myometrium and decidua cells is selectively increased with Treg [52], as well as with progesterone [143]. Galectin-1 induces effector T cell apoptosis [143]. Reduced galectin-1 expression may underlie Th1 and Th17 activation [140]. Glycodelin A (GdA) is abundantly expressed by decidua stroma and is bound with almost all T lymphocytes. Glycodelin A causes peripheral blood Th1 cell death, increasing expression of Fas and caspase 3- and 9- by Th1 cell subpopulation, having no such effect on Th2 cell subpopulation [54], which contributes to Th2 domination in the decidua at pregnancy.

At pregnancy production of pregnancy zone protein (PZP) and placental protein-14 (PP14) is significantly increased. PZP is found in blood serum, the zone of the uteroplacental bed, amniotic sac, macrophages, and syncytiotrophoblast cells. PP14 protein is discovered in the endometrium, decidua,

blood serum and amniotic fluid [117]. PZP and PP14 synergically increase T cell immunosuppression, displayed in reduction of T cell proliferative activity and reduction of IL-2 secretion by activated T cells. They have no effect on IL-4 secretion by activated T cells. Thus, they can promote Th1 proliferation inhibiting at pregnancy against the background of no negative effect on Th2 cell clonal proliferation [74, 117]. PZP is a protease inhibitor of wide specify, it effects lymphocyte migration, their cytotoxic activity and secretory specifics. PP14 shows immunosuppressive activity as well, it inhibits IL-2 and IL-1 β secretion by immune system cells, T cell blast-transformation and can induce T cell apoptosis [117].

Vasoactive intestinal peptide (VIP), which secretion peak in the zone of the uteroplacental bed occurs during early placentation period, increases Treg concentration in the decidua, stimulates LIF secretion by the trophoblast [34], and facilitates maintenance of tolerogenic phenotype of decidua macrophages [140]. VIP also reduces secretion of IL-6, MCP-1 and stimulates secretion of IL-10 by peripheral blood mononuclears in pregnant women [34], which can promote tolerance formation in the mother-fetus system.

Decidua stromal cells represent the source of CCL2, which promotes accumulation of Th2 cell subpopulation in the decidua [36]. It has been found that trophoblast secretory products reduce expression of STAT4 (specific for Th1 cells) transcription factors in T cells and stimulate expression of GATA3 and STAT6 (specific for Th2 cells) [63]. Secretory products of placenta, isolated cells of cytotrophoblast and syncytiotrophoblast stimulate CD4⁺ cell differentiation into Treg cells with phenotype CD127^{low}, CTLA-4^{high}, CD39^{high}, CD45R0 [120]. During activation these cells secrete lower amount of cytokines than control cells, and show increased secretion of IL-10, which corresponds to decidua Treg characteristics at early stages of pregnancy [120].

The mechanisms of T lymphocyte proliferative activity suppression from trophoblast [21, 28] include trophoblast capacity to inhibit T lymphocyte secretion of IFN γ , TNF- α , IL-2, IL-4, and IL-1, IL-17 [21, 63], and stimulate IL-5 secretion by activated T cells [21]. According to other researchers' information, trophoblast has the capacity to effect T lymphocyte secretion of IL-4 and IL-10 [63]. Trophoblast production of IDO and expression of HLA-G [48] can also reduce proliferative potential of T lymphocytes.

Among wide spectrum of extracellular proteins, produced by trophoblast and having inhibiting action on T lymphocytes, estradiol, progesterone, hCG, α -fetoprotein, HCS (human chorionic somatotropin, or human placental lactogen HPL), pregnancy-specific-beta1-glycoprotein (SP1), TGF- β 2, MIF,

thrombospondin-1, and some other, having immunoregulatory properties [28], may be pointed out.

Pregnancy specific glycoprotein 1a (PSG1a), produced by syncytiotrophoblast, can macrophage-mediate inhibit T lymphocyte proliferation and promote Th2 cytokine secretion [79]. It has been determined that trophoblast expresses receptors for IL-17. It has been shown that IL-17, secreted by Th17 cells, promotes proliferation and invasion of human trophoblast and trophoblast cell culture [90], stimulates trophoblast secretion of progesterone [101, 102], dose-dependently stimulates human trophoblast cell migration, and counteracts trophoblast cell apoptosis [135]. However, with excessive Th17 the cells cause fetus rejection [102].

The trophoblast contributes to the tolerance formation with respect to the fetus, among other due to stimulation of Treg differentiation [29]. One of the mechanisms of its realization is trophoblast IDO expression that promotes Treg differentiation [131]. Thymic stromal lymphopoietin (TSLP), secreted by the trophoblast, increases expression of molecules CD40, CD83, CD80, CD86, HLA-DR, O α -40L on decidual DCs, and stimulates their secretion of IL-10 and TGF- β [29], thus promoting formation of DC tolerogenic phenotype in zone of uteroplacental bed. RANTES, secreted by trophoblast and T cells, can be one of the mechanisms of tolerance formation, being, during the first trimester, a positive regulator of implantation through induction of pro-inflammatory cytokine secretion in moderate amounts, and, on the other hand, causing effector T cell apoptosis and promoting Treg differentiation [33, 140]. Recent researches indicate that sHLA-G5, secreted by trophoblast, promotes formation of Th17/Th2 cell pool in the decidua and reduces the amount of Th17/Th1 or Th17/Th0 clones [68]. Trophoblast cells are the source of hemoxygenase-1 (HO-1), which significantly contributes to physiological pregnancy establishment and immune tolerance formation. Hemoxygenase-1 also shows antiapoptotic action on decidua and placenta cells, it is required for maintenance of trophoblast stem cell vitality and their differentiation. HO-1 stimulation results in the increase of the Treg pool in the decidua and placenta, and Tregs, in turn, stimulate HO-1 expression by trophoblast cells [53].

Thus, decidua and placenta cells secrete a wide spectrum of molecules, controlling vital functions of individual Th lymphocyte subpopulations, their migration into the decidua, alteration in proportion of subpopulation T cell content, their proliferation and functional activity [63].

Conclusion

In spite of a significantly increased volume of information about subpopulation content

of CD4⁺Th lymphocytes, peculiarities of their differentiation, migration and localization, the question about role of specific subpopulations in immune tolerance induction and maintenance in the mother-fetus system remains open. In the last ten years, a correction of ideas about the role of Th1\Th2 lymphocytes and cytokines, secreted by them, in physiological pregnancy maintenance took place, a lot of information about the role of other Th lymphocyte subpopulations in maintenance of pregnancy occurred. Besides Th1 and Th2 participation, the role of Th17 and Treg in maintenance of physiological gestation course, supplementing the known paradigm Th1\Th2, is the best described. At the same time, it should be admitted that the description of versatile relationships of Th lymphocyte subpopulations with each other and microenvironment cells, capable of changing Th lymphocyte behavior up to correcting their differentiation path, seems to be quite close to *in vivo* situation. It is connected with rapidly changing situations, especially at early stages of pregnancy, when dynamics of relationships between various cell populations alters within a day or even hours. Previously described decidualization of endometrium at pregnancy, rapid change of quantitative and qualitative leukocyte content in the endometrium and decidua, increase of lymphangiogenesis in the

endometrium, localization in the decidua of NK cells, various T lymphocyte subpopulations, professional antigen-presenting cells – DCs, macrophages [22, 93] and their possible migration into regional lymph nodes, specific cytokine and cell microenvironment together indicates a possible commitment of naive T lymphocyte differentiation in direction of Treg or Th2 directly in the decidua. Literature analysis indicates that the main direction of immune system cell activity in zone of uteroplacental bed is connected not so much with effector functions, as with immunoregulatory ones. Among effector functions, cytotoxic reactions, controlling trophoblast proliferation and invasion, as well as inducing processes of cytotoxic cell apoptosis, play a significant role. It is very similar to the immune structure of skin and mucous membranes. At the same time, lack of morphologic structures, combining immunocompetent cells in the zone of the uteroplacental bed by the type of lymphoid follicles (or other formations like Peyer's patches in the intestine) in connection with lack of necessity to activate antibody response, makes them more mobile in functional and phenotype transformations, required, first of all, for their realization of regulatory mechanisms.

Список литературы / References

1. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinsky S.A., Simbircev A.S. Cytokines. St. Petersburg: Foliant, 2008. 552 p.]
2. Кречетова Л.В., Тетруашвили Н.К., Вторушина В.В., Степанова Е.О., Николаева М.А., Голубева Е.Л., Хачатрян Н.А. Динамика субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови в первом триместре беременности у женщин с привычным выкидышем на фоне проведения иммуноцитотерапии // Акушерство и гинекология, 2015. № 6. С. 59-66. [Krechetova L.V., Tetrushvili N.K., Vtorushina V.V., Stepanova E.A., Nikolaeva M.A., Golubeva E.L., Khachatryan N. Dynamics subpopulation composition of peripheral blood lymphocytes in the first trimester of pregnancy in women with recurrent miscarriage on the background of immunochemotherapy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2015, no. 6, pp. 59-66. (In Russ.)]
3. Соколов Д.И., Сельков С.А. Децидуальные макрофаги: роль в иммунном диалоге матери и плода // Иммунология, 2014. Т. 35, № 2. С. 113-117. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Decidual macrophages: role in immune dialogue between mother and fetus. *Immunologiya = Immunology*, 2014, Vol. 35, no. 2, pp. 113-117. (In Russ.)]
4. Alcaide P., Maganto-Garcia E., Newton G., Travers R., Croce K.J., Bu D.X., Luscinskas F.W., Lichtman A.H. Difference in Th1 and Th17 lymphocyte adhesion to endothelium. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 3, pp. 1421-1430.
5. Alizadeh D., Larmonier N. Generation and expansion of T helper 17 lymphocytes *ex vivo*. *Methods Mol. Biol.*, 2016, Vol. 1371, pp. 101-13.
6. Amarnath S., Mangus C.W., Wang J.C., Wei F., He A., Kapoor V., Foley J.E., Massey P.R., Felizardo T.C., Riley J.L., Levine B.L., June C.H., Medin J.A., Fowler D.H. The PDL1-PD1 axis converts human TH1 cells into regulatory T cells. *Sci Transl. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 111, p. 111ra120.
7. Annunziato F., Cosmi L., Liotta F., Maggi E., Romagnani S. The phenotype of human Th17 cells and their precursors, the cytokines that mediate their differentiation and the role of Th17 cells in inflammation. *International Immunology*, 2008, Vol. 20, no. 11, pp. 1361-1368.
8. Arasteh J., Ebtekar M., Pourpak Z., Pourfatollah A.A., Hassan Z.M., Kardar G.A., Zare A., Saghaei S., Tabar Molla Hassan A. The Effect of IL-22 and IL-28 in Induction of Type 1 Regulatory T (Tr1) Cells. *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 158-167.
9. Awasthi A., Carrier Y., Peron J.P., Bettelli E., Kamanaka M., Flavell R.A., Kuchroo V.K., Oukka M., Weiner H.L. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 1380-1389.
10. Baecher-Allan C., Wolf E., Hafler D.A. MHC class II expression identifies functionally distinct human regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 8, pp. 4622-4631.
11. Bengsch B., Seigel B., Flecken T., Wolanski J., Blum H.E., Thimme R. Human Th17 cells express high levels of enzymatically active dipeptidylpeptidase IV (CD26). *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 11, pp. 5438-5447.

12. Brogin Moreli J., Cirino Ruocco A.M., Vernini J.M., Rudge M.V., Calderon I.M. Interleukin 10 and tumor necrosis factor-alpha in pregnancy: aspects of interest in clinical obstetrics. *ISRN Obstet. Gynecol.*, 2012, Vol. 2012, p. 230742.
13. Chaouat G., Ledee-Bataille N., Dubanchet S. Immune cells in uteroplacental tissues throughout pregnancy: a brief review. *Reprod. Biomed. Online*, 2007, Vol. 14, no. 2, pp. 256-266.
14. Chaouat G., Zourbas S., Ostojic S., Lappree-Delage G., Dubanchet S., Ledee N., Martal J. A brief review of recent data on some cytokine expressions at the materno-foetal interface which might challenge the classical Th1/Th2 dichotomy. *J. Reprod. Immunol.*, 2002, Vol. 53, no. 1-2, pp. 241-256.
15. Chen Q., Muramoto K., Masaaki N., Ding Y., Yang H., Mackey M., Li W., Inoue Y., Ackermann K., Shiota H., Matsumoto I., Spyvee M., Schiller S., Sumida T., Gusovsky F., Lamphier M. A novel antagonist of the prostaglandin E(2) EP(4) receptor inhibits Th1 differentiation and Th17 expansion and is orally active in arthritis models. *Br. J. Pharmacol.*, 2010, Vol. 160, no. 2, pp. 292-310.
16. Chen S.J., Liu Y.L., Sytwu H.K. Immunologic regulation in pregnancy: from mechanism to therapeutic strategy for immunomodulation. *Clin. Dev. Immunol.*, 2012, Vol. 2012, p. 258391.
17. Chen W., Jin W., Hardegen N., Lei K.J., Li L., Marinos N., McGrady G., Wahl S.M. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 12, pp. 1875-1886.
18. Chen W., Wahl S.M. TGF-beta: the missing link in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell-mediated immunosuppression. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2003, Vol. 14, no. 2, pp. 85-89.
19. Chen X., Oppenheim J.J. Th17 cells and Tregs: unlikely allies. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, Vol. 95, no. 5, pp. 723-731.
20. Chenery A., Burrows K., Antignano F., Underhill T.M., Petkovich M., Zaph C. The retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26b1 regulates CD4 T cell differentiation and function. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 8, p. e72308.
21. Choi J.H., Jung J., Na K.H., Cho K.J., Yoon T.K., Kim G.J. Effect of mesenchymal stem cells and extracts derived from the placenta on trophoblast invasion and immune responses. *Stem. Cells Dev.*, 2014, Vol. 23, no. 2, pp. 132-145.
22. Collins M.K., Tay C.S., Erlebacher A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J. Clin. Invest.*, 2009, Vol. 119, no. 7, pp. 2062-2073.
23. Cosmi L., de Palma R., Santarlasci V., Maggi E., Capone M., Frosali F., Rodolico G., Querci V., Abbate G., Angeli R., Berrino L., Fambrini M., Caproni M., Tonelli F., Lazzeri E., Parronchi P., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺CD4⁺ T cell precursor. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 8, pp. 1903-1916.
24. Cosmi L., Liotta F., Angeli R., Mazzinghi B., Santarlasci V., Manetti R., Lasagni L., Vanini V., Romagnani P., Maggi E., Annunziato F., Romagnani S. Th2 cells are less susceptible than Th1 cells to the suppressive activity of CD25⁺ regulatory thymocytes because of their responsiveness to different cytokines. *Blood*, 2004, Vol. 103, no. 8, pp. 3117-3121.
25. Dealtry G.B., O'Farrell M.K., Fernandez N. The Th2 cytokine environment of the placenta. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 2000, Vol. 123, no. 2, pp. 107-119.
26. Diehl S., Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol.*, 2002, Vol. 39, no. 9, pp. 531-536.
27. Dierselhuis M.P., Jankowska-Gan E., Blokland E., Pool J., Burlingham W.J., van Halteren A.G., Goulmy E. HY immune tolerance is common in women without male offspring. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 3, p. e91274.
28. Dong M., Ding G., Zhou J., Wang H., Zhao Y., Huang H. The effect of trophoblasts on T lymphocytes: possible regulatory effector molecules – a proteomic analysis. *Cell Physiol. Biochem.*, 2008, Vol. 21, no. 5-6, pp. 463-472.
29. Du M.R., Guo P.F., Piao H.L., Wang S.C., Sun C., Jin L.P., Tao Y., Li Y.H., Zhang D., Zhu R., Fu Q., Li D.J. Embryonic trophoblasts induce decidual regulatory T cell differentiation and maternal-fetal tolerance through thymic stromal lymphopoietin instructing dendritic cells. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 4, pp. 1502-1511.
30. Dutta P., Burlingham W.J. Microchimerism: tolerance vs. sensitization. *Curr. Opin. Organ. Transplant.*, 2011, Vol. 16, no. 4, pp. 359-365.
31. Eblen A.C., Gercel-Taylor C., Nakajima S.T., Taylor D.D. Modulation of T-cell CD3-zeta chain expression in early pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2002, Vol. 47, no. 3, pp. 167-173.
32. Ernerudh J., Berg G., Mjosberg J. Regulatory T helper cells in pregnancy and their roles in systemic versus local immune tolerance. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 66, Suppl. 1, pp. 31-43.
33. Fraccaroli L., Alfieri J., Larocca L., Calafat M., Mor G., Leiros C.P., Ramhorst R. A potential tolerogenic immune mechanism in a trophoblast cell line through the activation of chemokine-induced T cell death and regulatory T cell modulation. *Hum. Reprod.*, 2009, Vol. 24, no. 1, pp. 166-175.
34. Fraccaroli L., Alfieri J., Larocca L., Calafat M., Roca V., Lombardi E., Ramhorst R., Leiros C.P. VIP modulates the pro-inflammatory maternal response, inducing tolerance to trophoblast cells. *Br. J. Pharmacol.*, 2009, Vol. 156, no. 1, pp. 116-126.
35. Gavin M.A., Torgerson T.R., Houston E., DeRoos P., Ho W.Y., Stray-Pedersen A., Ocheltree E.L., Greenberg P.D., Ochs H.D., Rudensky A.Y. Single-cell analysis of normal and FOXP3-mutant human T cells: FOXP3 expression without regulatory T cell development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, no. 17, pp. 6659-6664.

36. He Y.Y., He X.J., Guo P.F., Du M.R., Shao J., Li M.Q., Li D.J. The decidual stromal cells-secreted CCL2 induces and maintains decidual leukocytes into Th2 bias in human early pregnancy. *Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 145, no. 2, pp. 161-173.
37. Hegazy A.N., Peine M., Helmstetter C., Panse I., Frohlich A., Bergthaler A., Flatz L., Pinschewer D.D., Radbruch A., Lohning M. Interferons direct Th2 cell reprogramming to generate a stable GATA-3(+)T-bet(+) cell subset with combined Th2 and Th1 cell functions. *Immunity*, 2010, Vol. 32, no. 1, pp. 116-128.
38. Heikkinen J., Mottonen M., Alanen A., Lassila O. Phenotypic characterization of regulatory T cells in the human decidua. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 136, no. 2, pp. 373-378.
39. Hirota K., Yoshitomi H., Hashimoto M., Maeda S., Teradaira S., Sugimoto N., Yamaguchi T., Nomura T., Ito H., Nakamura T., Sakaguchi N., Sakaguchi S. Preferential recruitment of CCR6-expressing Th17 cells to inflamed joints via CCL20 in rheumatoid arthritis and its animal model. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 12, pp. 2803-2812.
40. Huss D.J., Winger R.C., Peng H., Yang Y., Racke M.K., Lovett-Racke A.E. TGF-beta enhances effector Th1 cell activation but promotes self-regulation via IL-10. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 10, pp. 5628-5636.
41. Ichiyama K., Hashimoto M., Sekiya T., Nakagawa R., Wakabayashi Y., Sugiyama Y., Komai K., Saba I., Moroy T., Yoshimura A. Gfi1 negatively regulates T(h)17 differentiation by inhibiting RORgamma activity. *Int. Immunol.*, 2009, Vol. 21, no. 7, pp. 881-889.
42. Ishigame H., Zenewicz L.A., Sanjabi S., Licona-Limon P., Nakayama M., Leonard W.J., Flavell R.A. Excessive Th1 responses due to the absence of TGF-beta signaling cause autoimmune diabetes and dysregulated Treg cell homeostasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, Vol. 110, no. 17, pp. 6961-6966.
43. Ito M., Nakashima A., Hidaka T., Okabe M., Bac N.D., Ina S., Yoneda S., Shiozaki A., Sumi S., Tsuneyama K., Nikaido T., Saito S. A role for IL-17 in induction of an inflammation at the fetomaternal interface in preterm labour. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 84, no. 1, pp. 75-85.
44. Jin L.P., Fan D.X., Li D.J. Regulation of costimulatory signal in maternal-fetal immune tolerance. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 66, no. 2, pp. 76-83.
45. Kaplan M.H., Hufford M.M., Olson M.R. The development and *in vivo* function of T helper 9 cells. *Nat. Rev. Immunol.*, 2015, Vol. 15, no. 5, pp. 295-307.
46. Kim C.H. Migration and function of Th17 cells. *Inflamm. Allergy Drug Targets*, 2009, Vol. 8, no. 3, pp. 221-228.
47. Kinder J.M., Jiang T.T., Ertelt J.M., Xin L., Strong B.S., Shaaban A.F., Way S.S. Cross-generational reproductive fitness enforced by microchimeric maternal cells. *Cell*, 2015, Vol. 162, no. 3, pp. 505-515.
48. Koch C.A., Platt J.L. T cell recognition and immunity in the fetus and mother. *Cell. Immunol.*, 2007, Vol. 248, no. 1, pp. 12-17.
49. Kolar P., Knieke K., Hegel J.K., Quandt D., Burmester G.R., Hoff H., Brunner-Weinzierl M.C. CTLA-4 (CD152) controls homeostasis and suppressive capacity of regulatory T cells in mice. *Arthritis Rheum.*, 2009, Vol. 60, no. 1, pp. 123-132.
50. Komai-Koma M., Wang E., Kurowska-Stolarska M., Li D., McSharry C., Xu D. Interleukin-33 promoting Th1 lymphocyte differentiation depends on IL-12. *Immunobiology*, 2016, Vol. 221, no. 3, pp. 412-417.
51. Kwan M., Hazan A., Zhang J., Jones R.L., Harris L.K., Whittle W., Keating S., Dunk C.E., Lye S.J. Dynamic changes in maternal decidual leukocyte populations from first to second trimester gestation. *Placenta*, 2014, Vol. 35, no. 12, pp. 1027-1034.
52. Leber A., Teles A., Zenclussen A.C. Regulatory T cells and their role in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 445-459.
53. Leber A., Zenclussen M.L., Teles A., Brachwitz N., Casalis P., El-Mousleh T., Jensen F., Woidacki K., Zenclussen A.C. Pregnancy: tolerance and suppression of immune responses. *Methods Mol. Biol.*, 2011, Vol. 677, pp. 397-417.
54. Lee C.L., Chiu P.C., Lam K.K., Siu S.O., Chu I.K., Koistinen R., Koistinen H., Seppala M., Lee K.F., Yeung W.S. Differential actions of glycodeclin-A on Th-1 and Th-2 cells: a paracrine mechanism that could produce the Th-2 dominant environment during pregnancy. *Hum. Reprod.*, 2011, Vol. 26, no. 3, pp. 517-526.
55. Lee J.H., Ulrich B., Cho J., Park J., Kim C.H. Progesterone promotes differentiation of human cord blood fetal T cells into T regulatory cells but suppresses their differentiation into Th17 cells. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 187, no. 4, pp. 1778-1787.
56. Lee S.K., Kim J.Y., Lee M., Gilman-Sachs A., Kwak-Kim J. Th17 and regulatory T cells in women with recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2012, Vol. 67, no. 4, pp. 311-318.
57. Lee S.W., Choi H., Eun S.Y., Fukuyama S., Croft M. Nitric oxide modulates TGF-beta-directive signals to suppress Foxp3⁺ regulatory T cell differentiation and potentiate Th1 development. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, no. 12, pp. 6972-6980.
58. Lexberg M.H., Taubner A., Albrecht I., Lepenies I., Richter A., Kamradt T., Radbruch A., Chang H.D. IFN-gamma and IL-12 synergize to convert *in vivo* generated Th17 into Th1/Th17 cells. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 11, pp. 3017-3027.
59. Li M.O., Wan Y.Y., Flavell R.A. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity*, 2007, Vol. 26, no. 5, pp. 579-591.
60. Li Q., Laumonnier Y., Syrovets T., Simmet T. Recruitment of CCR6-expressing Th17 cells by CCL20 secreted from plasmin-stimulated macrophages. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*, 2013, Vol. 45, no. 7, pp. 593-600.

61. Liang S., Alard P., Zhao Y., Parnell S., Clark S.L., Kosiewicz M.M. Conversion of CD4⁺CD25⁻ cells into CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells *in vivo* requires B7 costimulation, but not the thymus. *J. Exp. Med.*, 2005, Vol. 201, no. 1, pp. 127-137.
62. Lissauer D., Goodyear O., Khanum R., Moss P.A., Kilby M.D. Profile of maternal CD4 T-cell effector function during normal pregnancy and in women with a history of recurrent miscarriage. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2014, Vol. 126, no. 5, pp. 347-54.
63. Liu F., Guo J., Tian T., Wang H., Dong F., Huang H., Dong M. Placental trophoblasts shifted Th1/Th2 balance toward Th2 and inhibited Th17 immunity at fetomaternal interface. *APMIS*, 2011, Vol. 119, no. 9, pp. 597-604.
64. Liu H.P., Cao A.T., Feng T., Li Q., Zhang W., Yao S., Dann S.M., Elson C.O., Cong Y. TGF-beta converts Th1 cells into Th17 cells through stimulation of Runx1 expression. *Eur. J. Immunol.*, 2015, Vol. 45, no. 4, pp. 1010-1018.
65. Liu H.Y., Liu Z.K., Chao H., Li Z., Song Z., Yang Y., Peng J.P. High-dose interferon-gamma promotes abortion in mice by suppressing Treg and Th17 polarization. *J. Interferon. Cytokine Res.*, 2014, Vol. 34, no. 5, pp. 394-403.
66. Liu W., Putnam A.L., Xu-Yu Z., Szot G.L., Lee M.R., Zhu S., Gottlieb P.A., Kapranov P., Gingeras T.R., Fazekas de St Groth B., Clayberger C., Soper D.M., Ziegler S.F., Bluestone J.A. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 7, pp. 1701-1711.
67. Liu Y.S., Wu L., Tong X.H., Wu L.M., He G.P., Zhou G.X., Luo L.H., Luan H.B. Study on the relationship between Th17 cells and unexplained recurrent spontaneous abortion. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2011, Vol. 65, no. 5, pp. 503-511.
68. Lombardelli L., Logiodice F., Aguerre-Girr M., Kullolli O., Haller H., Casart Y., Berrebi A., L'Faqihi-Olive F.E., Duplan V., Romagnani S., Maggi E., Rukavina D., Le Bouteiller P., Piccinni M.P. Interleukin-17-producing decidual CD4⁺ T cells are not deleterious for human pregnancy when they also produce interleukin-4. *Clin. Mol. Allergy*, 2016, Vol. 14, p. 1.
69. Luppi P., Haluszczak C., Trucco M., Deloia J.A. Normal pregnancy is associated with peripheral leukocyte activation. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2002, Vol. 47, no. 2, pp. 72-81.
70. Manel N., Unutmaz D., Littman D.R. The differentiation of human T(H)-17 cells requires transforming growth factor-beta and induction of the nuclear receptor RORgamma. *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 6, pp. 641-649.
71. Mangan P.R., Harrington L.E., O'Quinn D.B., Helms W.S., Bullard D.C., Elson C.O., Hatton R.D., Wahl S.M., Schoeb T.R., Weaver C.T. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*, 2006, Vol. 441, no. 7090, pp. 231-234.
72. McGeachy M.J., Cua D.J. T cells doing it for themselves: TGF-beta regulation of Th1 and Th17 cells. *Immunity*, 2007, Vol. 26, no. 5, pp. 547-549.
73. Mingari M.C., Maggi E., Cambiaggi A., Annunziato F., Schiavetti F., Manetti R., Moretta L., Romagnani S. Development *in vitro* of human CD4⁺ thymocytes into functionally mature Th2 cells. Exogenous interleukin-12 is required for priming thymocytes to produce both Th1 cytokines and interleukin-10. *Eur. J. Immunol.*, 1996, Vol. 26, no. 5, pp. 1083-1087.
74. Mishan-Eisenberg G., Borovsky Z., Weber M.C., Gazit R., Tykocinski M.L., Rachmilewitz J. Differential regulation of Th1/Th2 cytokine responses by placental protein 14. *J. Immunol.*, 2004, Vol. 173, no. 9, pp. 5524-30.
75. Miyaura H., Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 3, pp. 1087-1094.
76. Miyazaki S., Tsuda H., Sakai M., Hori S., Sasaki Y., Futatani T., Miyawaki T., Saito S. Predominance of Th2-promoting dendritic cells in early human pregnancy decidua. *J. Leukoc. Biol.*, 2003, Vol. 74, no. 4, pp. 514-522.
77. Mjosberg J., Berg G., Jenmalm M.C., Ernerudh J. FOXP3⁺ regulatory T cells and T helper 1, T helper 2, and T helper 17 cells in human early pregnancy decidua. *Biology of Reproduction*, 2010, Vol. 82, pp. 698-705.
78. Mjosberg J., Svensson J., Johansson E., Hellstrom L., Casas R., Jenmalm M.C., Boij R., Matthiesen L., Jonsson J.I., Berg G., Ernerudh J. Systemic reduction of functionally suppressive CD4^{dim}CD25^{high}Foxp3⁺ Tregs in human second trimester pregnancy is induced by progesterone and 17beta-estradiol. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 1, pp. 759-769.
79. Motran C.C., Diaz F.L., Montes C.L., Bocco J.L., Gruppi A. *In vivo* expression of recombinant pregnancy-specific glycoprotein 1a induces alternative activation of monocytes and enhances Th2-type immune response. *Eur. J. Immunol.*, 2003, Vol. 33, no. 11, pp. 3007-3016.
80. Nakamura K., Kitani A., Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 5, pp. 629-644.
81. Nakashima A., Ito M., Yoneda S., Shiozaki A., Hidaka T., Saito S. Circulating and decidual Th17 cell levels in healthy pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 2, pp. 104-109.
82. Nancy P., Erlebacher A. T cell behavior at the maternal-fetal interface. *Int. J. Dev. Biol.*, 2014, Vol. 58, no. 2-4, pp. 189-198.
83. Nancy P., Tagliani E., Tay C.-S., Asp P., Levy D.E., Erlebacher A. Chemokine gene silencing in decidual stromal cells limits T cell access to the maternal-fetal interface. *Science*, 2012, Vol. 336, no. 6086, pp. 1317-1321.
84. Norton M.T., Fortner K.A., Bizargity P., Bonney E.A. Pregnancy alters the proliferation and apoptosis of mouse splenic erythroid lineage cells and leukocytes. *Biol. Reprod.*, 2009, Vol. 81, no. 3, pp. 457-464.

85. O'Garra A., Vieira P. Regulatory T cells and mechanisms of immune system control. *Nat. Med.*, 2004, Vol. 10, no. 8, pp. 801-805.
86. Park I.K., Letterio J.J., Gorham J.D. TGF-beta 1 inhibition of IFN-gamma-induced signaling and Th1 gene expression in CD4⁺ T cells is Smad3 independent but MAP kinase dependent. *Mol. Immunol.*, 2007, Vol. 44, no. 13, pp. 3283-3290.
87. Peterson R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicologic Pathology*, 2012, Vol. 40, no. 2, pp. 186-204.
88. Peterson R.A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. *Toxicol. Pathol.*, 2012, Vol. 40, no. 2, pp. 186-204.
89. Piccinni M.P., Lombardelli L., Logiodice F., Kullolli O., Romagnani S., Le Bouteiller P. T helper cell mediated-tolerance towards fetal allograft in successful pregnancy. *Clin. Mol. Allergy*, 2015, Vol. 13, no. 1, p. 9.
90. Pongcharoen S., Niumsup P., Sanguanserm Sri D., Supalap K., Butkhamchot P. The effect of interleukin-17 on the proliferation and invasion of JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2006, Vol. 55, no. 4, pp. 291-300.
91. Prochazkova J., Pokorna K., Holan V. IL-12 inhibits the TGF-beta-dependent T cell developmental programs and skews the TGF-beta-induced differentiation into a Th1-like direction. *Immunobiology*, 2012, Vol. 217, no. 1, pp. 74-82.
92. Reboldi A., Coisne C., Baumjohann D., Benvenuto F., Bottinelli D., Lira S., Uccelli A., Lanzavecchia A., Engelhardt B., Sallusto F. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 5, pp. 514-523.
93. Red-Horse K., Rivera J., Schanz A., Zhou Y., Winn V., Kapidzic M., Maltepe E., Okazaki K., Kochman R., Vo K.C., Giudice L., Erlebacher A., McCune J.M., Stoddart C.A., Fisher S.J. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an *in vivo* model of human placentation. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 10, pp. 2643-2652.
94. Reina M., Broccia M.L., Menegola E., Di Blasio A.M., Vigano P., Giavini E. Effects of interleukin-12 administration during the pre- and peri-implantation period on mouse embryofetal development. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2004, Vol. 51, no. 5, pp. 345-351.
95. Ren Y., Yang B., Yin Y., Leng X., Jiang Y., Zhang L., Li Y., Li X., Zhang F., He W., Zhang X., Cao X. Aberrant CD200/CD200R1 expression and its potential role in Th17 cell differentiation, chemotaxis and osteoclastogenesis in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2015, Vol. 54, no. 4, pp. 712-721.
96. Robertson S.A., Moldenhauer L.M. Immunological determinants of implantation success. *The International Journal of Developmental Biology*, 2014, Vol. 58, pp. 205-217.
97. Romagnani S., Maggi E., Liotta F., Cosmi L., Annunziato F. Properties and origin of human Th17 cells. *Mol. Immunol.*, 2009, Vol. 47, no. 1, pp. 3-7.
98. Rowe J.H., Ertelt J.M., Aguilera M.N., Farrar M.A., Way S.S. Foxp3(+) regulatory T cell expansion required for sustaining pregnancy compromises host defense against prenatal bacterial pathogens. *Cell. Host. Microbe*, 2011, Vol. 10, no. 1, pp. 54-64.
99. Rowe J.H., Ertelt J.M., Xin L., Way S.S. Pregnancy imprints regulatory memory that sustains anergy to fetal antigen. *Nature*, 2012, Vol. 490, no. 7418, pp. 102-106.
100. Sacks G.P., Redman C.W., Sargent I.L. Monocytes are primed to produce the Th1 type cytokine IL-12 in normal human pregnancy: an intracellular flow cytometric analysis of peripheral blood mononuclear cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 2003, Vol. 131, no. 3, pp. 490-497.
101. Saito S., Nakashima A., Ito M., Shima T. Clinical implication of recent advances in our understanding of IL-17 and reproductive immunology. *Expert Rev Clin Immunol.*, 2011, Vol. 7, no. 5, pp. 649-657.
102. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 601-610.
103. Saito S., Tsukaguchi N., Hasegawa T., Michimata T., Tsuda H., Narita N. Distribution of Th1, Th2, and Th0 and the Th1/Th2 cell ratios in human peripheral and endometrial T cells. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 1999, Vol. 42, no. 4, pp. 240-245.
104. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Shimizu J., Yamazaki S., Sakihama T., Itoh M., Kuniyasu Y., Nomura T., Toda M., Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.*, 2001, Vol. 182, pp. 18-32.
105. Sallusto F., Lenig D., Mackay C.R., Lanzavecchia A. Flexible programs of chemokine receptor expression on human polarized T helper 1 and 2 lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 187, no. 6, pp. 875-883.
106. Sallusto F., Zielinski C.E., Lanzavecchia A. Human Th17 subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 9, pp. 2215-2220.
107. Samstein R.M., Josefowicz S.Z., Arvey A., Treuting P.M., Rudensky A.Y. Extrathymic generation of regulatory T cells in placental mammals mitigates maternal-fetal conflict. *Cell*, 2012, Vol. 150, no. 1, pp. 29-38.
108. Sanchez-Ramon S., Navarro A.J., Aristimuno C., Rodriguez-Mahou M., Bellon J.M., Fernandez-Cruz E., de Andres C. Pregnancy-induced expansion of regulatory T lymphocytes may mediate protection to multiple sclerosis activity. *Immunol. Lett.*, 2005, Vol. 96, no. 2, pp. 195-201.
109. Sansom D.M., Walker L.S. The role of CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 212, pp. 131-148.

110. Santarlasci V., Cosmi L., Maggi L., Liotta F., Annunziato F. IL-1 and T Helper Immune Responses. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 182.
111. Santarlasci V., Maggi L., Capone M., Frosali F., Querci V., De Palma R., Liotta F., Cosmi L., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. TGF-beta indirectly favors the development of human Th17 cells by inhibiting Th1 cells. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 1, pp. 207-215.
112. Sasaki Y., Sakai M., Miyazaki S., Higuma S., Shiozaki A., Saito S. Decidual and peripheral blood CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in early pregnancy subjects and spontaneous abortion cases. *Mol. Hum. Reprod.*, 2004, Vol. 10, no. 5, pp. 347-353.
113. Sato W., Aranami T., Yamamura T. Cutting edge: Human Th17 cells are identified as bearing CCR2⁺CCR5⁻ phenotype. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 12, pp. 7525-7529.
114. Schmitt N., Ueno H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Curr. Opin. Immunol.*, 2015, Vol. 34, pp. 130-136.
115. Shen E., Zhao K., Wu C., Yang B. The suppressive effect of CD25⁺Treg cells on Th1 differentiation requires cell-cell contact partially via TGF-beta production. *Cell. Biol. Int.*, 2011, Vol. 35, no. 7, pp. 705-712.
116. Shima T., Sasaki Y., Itoh M., Nakashima A., Ishii N., Sugamura K., Saito S. Regulatory T cells are necessary for implantation and maintenance of early pregnancy but not late pregnancy in allogeneic mice. *J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 85, no. 2, pp. 121-129.
117. Skornicka E.L., Kiyatkina N., Weber M.C., Tykocinski M.L., Koo P.H. Pregnancy zone protein is a carrier and modulator of placental protein-14 in T-cell growth and cytokine production. *Cell. Immunol.*, 2004, Vol. 232, no. 1-2, pp. 144-156.
118. Somers D.A., Zheng Y., Kilby M.D., Sansom D.M., Drayson M.T. Normal human pregnancy is associated with an elevation in the immune suppressive CD25⁺CD4⁺ regulatory T-cell subset. *Immunology*, 2004, Vol. 112, no. 1, pp. 38-43.
119. Suzuki J., Maruyama S., Tamauchi H., Kuwahara M., Horiuchi M., Mizuki M., Ochi M., Sawazaki T., Zhu J., Yasukawa M., Yamashita M. Gfi1, a transcriptional repressor, inhibits the induction of the Th1 program in activated CD4 T cells. *Immunology*, 2016, Vol. 147, no. 4, pp. 476-487.
120. Svensson-Arvelund J., Mehta R.B., Lindau R., Mirrasekhian E., Rodriguez-Martinez H., Berg G., Lash G.E., Jenmalm M.C., Ernerudh J. The human fetal placenta promotes tolerance against the semiallogeneic fetus by inducing regulatory T cells and homeostatic M2 macrophages. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 194, no. 4, pp. 1534-1544.
121. Takimoto T., Wakabayashi Y., Sekiya T., Inoue N., Morita R., Ichiyama K., Takahashi R., Asakawa M., Muto G., Mori T., Hasegawa E., Saika S., Hara T., Nomura M., Yoshimura A. Smad2 and Smad3 are redundantly essential for the TGF-beta-mediated regulation of regulatory T plasticity and Th1 development. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 2, pp. 842-855.
122. Tang A.L., Teijaro J.R., Njau M.N., Chandran S.S., Azimzadeh A., Nadler S.G., Rothstein D.M., Farber D.L. CTLA4 expression is an indicator and regulator of steady-state CD4⁺ FoxP3⁺ T cell homeostasis. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 3, pp. 1806-1813.
123. Taylor D.D., Sullivan S.A., Eblen A.C., Gercel-Taylor C. Modulation of T-cell CD3-zeta chain expression during normal pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2002, Vol. 54, no. 1-2, pp. 15-31.
124. Tilburgs T., Roelen D.L., van der Mast B.J., de Groot-Swings G.M., Kleijburg C., Scherjon S.A., Claas F.H. Evidence for a selective migration of fetus-specific CD4⁺CD25^{bright} regulatory T cells from the peripheral blood to the decidua in human pregnancy. *The Journal of Immunology*, 2008, Vol. 180, pp. 5737-5745.
125. Tilburgs T., Roelen D.L., van der Mast B.J., van Schip J.J., Kleijburg C., de Groot-Swings G.M., Kanhai H.H., Claas F.H., Scherjon S.A. Differential distribution of CD4(+)CD25(bright) and CD8(+)CD28(-) T-cells in decidua and maternal blood during human pregnancy. *Placenta*, 2006, Vol. 27, Suppl. A, pp. S47-53.
126. Tofukuji S., Kuwahara M., Suzuki J., Ohara O., Nakayama T., Yamashita M. Identification of a new pathway for Th1 cell development induced by cooperative stimulation with IL-4 and TGF-beta. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, no. 10, pp. 4846-4857.
127. Truchetet M.E., Allanore Y., Montanari E., Chizzolini C., Brembilla N.C. Prostaglandin I(2) analogues enhance already exuberant Th17 cell responses in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2012, Vol. 71, no. 12, pp. 2044-2050.
128. Tsuda H., Michimata T., Sakai M., Nagata K., Nakamura M., Saito S. A novel surface molecule of Th2- and Tc2-type cells, CTRH2 expression on human peripheral and decidual CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the early stage of pregnancy. *Clin. Exp. Immunol.*, 2001, Vol. 123, no. 1, pp. 105-111.
129. Vassiliadou N., Bulmer J.N. Quantitative analysis of T lymphocyte subsets in pregnant and nonpregnant human endometrium. *Biol. Reprod.*, 1996, Vol. 55, no. 5, pp. 1017-1022.
130. White C.A., Johansson M., Roberts C.T., Ramsay A.J., Robertson S.A. Effect of interleukin-10 null mutation on maternal immune response and reproductive outcome in mice. *Biol. Reprod.*, 2004, Vol. 70, no. 1, pp. 123-131.
131. Wilczynski J.R., Kalinka J., Radwan M. The role of T-regulatory cells in pregnancy and cancer. *Front. Biosci.*, 2008, Vol. 13, pp. 2275-2289.
132. Wilczynski J.R., Tchorzewski H., Banasik M., Glowacka E., Wiecek A., Lewkowicz P., Malinowski A., Szpakowski M., Wilczynski J. Lymphocyte subset distribution and cytokine secretion in third trimester decidua in normal pregnancy and preeclampsia. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.*, 2002, Vol. 109, no. 1, pp. 8-15.

133. Williams P.J., Searle R.F., Robson S.C., Innes B.A., Bulmer J.N. Decidual leucocyte populations in early to late gestation normal human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2009, Vol. 82, no. 1, pp. 24-31.
134. Williams Z. Inducing tolerance to pregnancy. *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 367, no. 12, pp. 1159-1161.
135. Wu H.X., Jin L.P., Xu B., Liang S.S., Li D.J. Decidual stromal cells recruit Th17 cells into decidua to promote proliferation and invasion of human trophoblast cells by secreting IL-17. *Cell Mol. Immunol.*, 2014, Vol. 11, no. 3, pp. 253-262.
136. Xin L., Ertelt J.M., Rowe J.H., Jiang T.T., Kinder J.M., Chaturvedi V., Elahi S., Way S.S. Cutting edge: committed Th1 CD4⁺ T cell differentiation blocks pregnancy-induced Foxp3 expression with antigen-specific fetal loss. *J. Immunol.*, 2014, Vol. 192, no. 7, pp. 2970-2974.
137. Xu D., Chan W.L., Leung B.P., Hunter D., Schulz K., Carter R.W., McInnes I.B., Robinson J.H., Liew F.Y. Selective expression and functions of interleukin 18 receptor on T helper (Th) type 1 but not Th2 cells. *J. Exp. Med.*, 1998, Vol. 188, no. 8, pp. 1485-1492.
138. Yu Q., Lou X.M., He Y. Preferential recruitment of Th17 cells to cervical cancer via CCR6-CCL20 pathway. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 3, p. e0120855.
139. Yu S., Jia L., Zhang Y., Zhong J., Yang B., Wu C. IL-12 induced the generation of IL-21- and IFN-gamma-co-expressing poly-functional CD4⁺ T cells from human naive CD4⁺ T cells. *Cell Cycle*, 2015, Vol. 14, no. 21, pp. 3362-3372.
140. Zenclussen A.C. Adaptive immune responses during pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2013, Vol. 69, no. 4, pp. 291-303.
141. Zenclussen A.C., Gerlof K., Zenclussen M.L., Ritschel S., Zambon Bertoja A., Fest S., Hontsu S., Ueha S., Matsushima K., Leber J., Volk H.D. Regulatory T cells induce a privileged tolerant microenvironment at the fetal-maternal interface. *Eur. J. Immunol.*, 2006, Vol. 36, no. 1, pp. 82-94.
142. Zenclussen M.L., Thuere C., Ahmad N., Wafula P.O., Fest S., Teles A., Leber A., Casalis P.A., Bechmann I., Priller J., Volk H.D., Zenclussen A.C. The persistence of paternal antigens in the maternal body is involved in regulatory T-cell expansion and fetal-maternal tolerance in murine pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol.*, 2010, Vol. 63, no. 3, pp. 200-208.
143. Zhang S., Lin H., Kong S., Wang S., Wanga H., Wanga H., Armant D.R. Physiological and molecular determinants of embryo implantation. *Molecular Aspects of Medicine*, 2013, Vol. 134, no. 5, pp. 939-980.

Авторы:

Соколов Д.И. — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им Д.О. Отта» Санкт-Петербург, Россия

Степанова О.И. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им Д.О. Отта» Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, руководитель отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии им Д.О. Отта» Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Head, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Stepanova O.I., PhD (Biology), Senior Research Associate, Cell Interactions Laboratory, Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Selkov S.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Immunology and Cell Interactions, D.O. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 02.08.2016
Принята к печати 31.08.2016

Received 02.08.2016
Accepted 31.08.2016

ХАРАКТЕРИСТИКА ПРОФИЛЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ ФЕНОТИПАМИ АЛЬФА-1-АНТИТРИПСИНА

Первакова М.Ю.¹, Лапин С.В.¹, Суркова Е.А.¹, Ткаченко О.Ю.¹,
Будкова А.И.¹, Гусева В.И.¹, Титова О.Н.¹, Эмануэль В.Л.¹,
Тотолян Арег А.^{1,2}

¹ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

² Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Альфа-1-антитрипсин (А1АТ) обладает широким спектром защитных эффектов, направленных на уменьшение вторичного повреждения при воспалении. Помимо ингибирования сериновых протеаз, А1АТ осуществляет регуляцию продукции провоспалительных цитокинов. Известно большое количество фенотипических вариантов А1АТ, которые могут изменять цитокиновый профиль при воспалительном процессе и повышать риск ассоциированных с дефицитом А1АТ заболеваний.

Целью нашего исследования являлась оценка цитокинового профиля у больных с различными фенотипами А1АТ.

Было собрано 86 образцов сыворотки крови больных с подозрением на дефицит А1АТ, в которых были определены фенотипы и концентрации А1АТ. В зависимости от фенотипа образцы были разделены на четыре группы: с PiMM, PiZZ, PiMZ и редкими фенотипами А1АТ. В этих группах были измерены уровни IFN γ , TNF α , IL-6, IL-8 и IL-17 методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем производства ООО «Цитокин» (Россия).

Уровень IL-6 оказался повышен в группе с PiZZ-фенотипом и составил $73,52 \pm 4,363$ pg/ml, тогда как при PiMM-фенотипе среднее значение IL-6 было $45,61 \pm 8,012$ pg/ml, $p < 0,05$. Также в группах с PiZZ- и PiMZ-фенотипами было обнаружено повышение IL-17 по сравнению с PiMM-фенотипом ($p < 0,001$). Средние значения IL-17 у больных с PiZZ-, PiMZ- и PiMM-фенотипами составили $80,13 \pm 13,56$ pg/ml, $106,7 \pm 26,28$ pg/ml и $42,73 \pm 18,52$ pg/ml соответственно. При этом уровни IL-8, IFN γ и TNF α не отличались при различных фенотипах А1АТ. Результаты нашего исследования позволяют сделать заключение, что дисбаланс цитокинов может играть важную роль в возникновении ассоциированных с дефицитом А1АТ заболеваний.

Ключевые слова: воспаление, альфа-1-антитрипсин, цитокин, фенотип альфа-1-антитрипсина, дефицит альфа-1-антитрипсина

Адрес для переписки:

Первакова Маргарита Юрьевна
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет имени
академика И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
197022, Россия, Санкт-Петербург, ул. Льва Толстого, 6-8.
Тел.: 8 (812) 499-71-94.
E-mail: margaritalerner@gmail.com

Address for correspondence:

Pervakova Margarita Yu.
The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University
197022, Russian Federation, St. Petersburg,
L. Tolstoy str., 6/8.
Phone: 7 (812) 499-71-94.
E-mail: margaritalerner@gmail.com

Образец цитирования:

М.Ю. Первакова, С.В. Лапин, Е.А. Суркова,
О.Ю. Ткаченко, А.И. Будкова, В.И. Гусева, О.Н. Титова,
В.Л. Эмануэль, Арег А. Тотолян «Характеристика профиля
провоспалительных цитокинов у больных с различными
фенотипами альфа-1-антитрипсина» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 537-544.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-537-544

© Первакова М.Ю. и соавт., 2016

For citation:

M.Yu. Pervakova, S.V. Lapin, E.A. Surkova, O.Yu. Tkachenko,
A.I. Budkova, V.I. Guseva, O.N. Titova, V.L. Emanuel,
Areg A. Totolian "Proinflammatory cytokine profile in patients with
different alpha-1-antitrypsin phenotypes", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 6,
pp. 537-544. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-537-544

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-537-544>

PROINFLAMMATORY CYTOKINE PROFILE IN PATIENTS WITH DIFFERENT ALPHA-1-ANTITRYPSIN PHENOTYPES

Pervakova M.Yu.^a, Lapin S.V.^a, Surkova E.A.^a, Tkachenko O.Yu.^a,
Budkova A.I.^a, Guseva V.I.^a, Titova O.N.^a, Emanuel V.L.^a,
Totolian Areg A.^{a, b}

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

^b St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Alpha-1-antitrypsin (A1AT) exerts a wide spectrum of protective effects, being focused on reduction of secondary injury in inflammation. Moreover, A1AT inhibits some serine proteases, and down-regulates production of proinflammatory cytokines. A number of known A1AT phenotypes is accompanied by affection of cytokine profile in inflammatory processes, thus increasing the risk of disorders associated with A1AT deficiency.

The aim of our study was to evaluate cytokine profiles in the patients with different A1AT phenotypes.

Were collected eighty-six blood sera from the persons with suspected A1AT deficiency. The A1AT phenotypes and concentrations were determined in these samples. The patients were divided into four groups, depending on their A1AT variants, i.e., PiMM, PiZZ, PiMZ and rare A1AT phenotypes. The serum levels of IFN γ , TNF α , IL-6, IL-8, and IL-17 were measured in these groups by means of ELISA technique.

The mean levels of IL-6 comprised 73.52 ± 4.363 pg/ml in the patients with PiZZ phenotype, being higher than in cases of PiMM phenotype (45.61 ± 8.01 pg/ml, $p < 0.05$). The IL-17 levels were also found to be increased in the groups with PiZZ and PiMZ phenotypes, as compared with PiMM phenotype ($p < 0.001$). The mean IL-17 values in the samples with PiZZ, PiMZ, and PiMM phenotypes were 80.13 ± 13.56 pg/ml, 106.7 ± 26.28 pg/ml and 42.73 ± 18.52 pg/ml, respectively. Meanwhile, there were no significant differences in IL-8, IFN γ and TNF α levels among different A1AT phenotypes.

The results of this study let us conclude that the cytokine imbalance may be crucial to onset of diseases associated with A1AT deficiency.

Keywords: inflammation, alpha-1-antitrypsin, cytokine, alpha-1-antitrypsin phenotype, alpha-1-antitrypsin deficiency

Данное исследование было выполнено при поддержке Российского научного фонда (соглашение № 16-15-00118).

Введение

Альфа-1-антитрипсин (A1AT) представляет собой белок острой фазы, главной функцией которого является ингибирование протеаз, поступающих из гранулоцитов в воспалительные экссудаты и вызывающих вторичное повреждение тканей [1]. Дефицит A1AT провоцирует развитие заболеваний, связанных с избыточным действием протеаз. В частности, при недостаточном ингибировании A1AT нейтрофильной эластазы происходит протеолитическое разрушение межальвеолярных перегородок с формированием легочной эмфиземы [2]. Помимо ингибирования протеаз, A1AT выполняет ряд не связанных с подавлением протеолиза функций, например, обладает антиапоптотическим [3] и антиоксидантными действиями [4], а также взаимодейству-

ет с цитокинами и модулирует воспалительный процесс [5]. Таким образом, ассоциированные с дефицитом A1AT заболевания связаны не только с недостаточным подавлением протеолиза, но и активацией цитокинов, провоцирующих хроническое воспаление.

При действии патогена первыми начинают экспрессироваться основные эндогенные пирогены: IFN γ , TNF α , IL-1 β и IL-6, активирующиеся при любом островоспалительном процессе [6]. В частности, сигаретный дым запускает местную продукцию TNF α , IL-6 и IL-8 в дыхательных путях [7, 8]. Уровень IL-6 также коррелирует с уровнем давления в легочной артерии у больных хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ), осложненной легочным сердцем [9]. Повышенную активность IL-8 обнаруживают также при пневмонии и других воспалительных легочных заболеваниях [10], а TNF α и IL-17 выявляются при бронхиальной астме и аутоиммунных процессах [11, 12, 13].

При тканевом воспалении A1AT подавляет активацию транскрипционного фактора NF- κ B и выступает в роли антагониста провоспалительных цитокинов [14]. Под действием A1AT снижается экспрессия TNF α , стимулированная IFN γ и другими факторами [15, 16] и регулируется передача сигнала рецептором TNF α [17]. Также A1AT регулирует островоспалительный ответ, снижая продукцию IL-1 β , IL-6, IL-8 [18], IL-17 [19]. Молекула A1AT способна связывать IL-8 с образованием комплекса A1AT – IL-8, в котором хемокин теряет способность привлекать нейтрофилы [20].

Молекула A1AT закодирована в гене Pi (Protease inhibitor, 14q32), аллели которого определяют фенотип A1AT [21]. Наиболее распространен PiM аллель, при котором молекула A1AT функционирует полноценно, а нормальный фенотип молекулы A1AT по аналогии обозначают PiMM. Наиболее часто патологические аллели, вызывающие дефицит A1AT, представлены PiZ и PiS вариантами [22].

Клинически значимый дефицит A1AT чаще возникает при наличии мутации в обоих аллелях гена Pi и обычно обусловлен PiZZ-фенотипом, тогда как у гетерозигот дефект частично компенсируется нормальной функцией второго аллеля [23]. Несмотря на то, что модулирующий эффект A1AT на провоспалительные цитокины был доказан *in vitro*, в сыворотке больных ХОБЛ с дефицитом A1AT было обнаружено пониженное содержание TNF α , IL-6 и IL-1 β по сравнению с больными ХОБЛ с нормальным A1AT [24].

Кроме того, остается неизученным большое количество промежуточных вариантов, включая распространенный PiMZ-фенотип и различные фенотипы (PiMI, PiMF, PiMG и др.), клиническое значение которых остается неопределенным.

Клиническая значимость гетерозиготных фенотипов A1AT была продемонстрирована у больных гранулематозом с полиангиитом (ГПА) у которых частота патологических фенотипов A1AT составила 18,2%. При выявлении патологического фенотипа A1AT активность васкулита и уровень антител к протеиназе 3 были выше [25]. Вероятно, гетерозиготные фенотипы A1AT имеют значение и при других заболеваниях, что делает целесообразной оценку маркеров воспаления при различных фенотипах A1AT.

Целью нашего исследования являлась оценка цитокинового профиля при PiMM, PiZZ, PiMZ и других редких фенотипах A1AT.

Материалы и методы

Мы собрали 86 образцов сыворотки крови больных, поступивших в лабораторию с подозрением на дефицит A1AT. В выборку вошли 69 больных ХОБЛ и 5 больных ГПА. Мы оптимизировали метод изоэлектрофокусирования (ИЭФ), который позволяет выявлять не только PiM, PiS и PiZ, но и многие другие редкие фенотипы A1AT [26].

Изображение редких фенотипов A1AT представлено на рисунке 1

В зависимости от фенотипа A1AT, определенного методом ИЭФ, образцы были поделены на четыре группы: PiMM (n = 86), PiZZ (n = 12), PiMZ (n = 15) и группу с редкими фенотипами A1AT: 2PiSS, 2PiMI, PiML, PiMF, PiMC, PiMG. Были собраны дополнительные лабораторные данные, включающие уровень лейкоцитов, СОЭ, С-реактивный белок и фибриноген.

Мы определили содержание цитокинов IFN γ , TNF α , IL-6, IL-8 и IL-17 методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих тест-систем производства «ООО Цитокин» (Россия). Уровень IFN γ , TNF α , IL-6, IL-8 был измерен в следующих образцах: PiMM (n = 10), PiZZ (n = 12), PiMZ (n = 15) и редкие фенотипы (n = 6). Содержание IL-17 было определено при PiMM (n = 31), PiZZ (n = 12), PiMZ (n = 15) и редких фенотипах (n = 8).

Концентрация A1AT определялась иммунотурбидиметрическим методом на биохими-

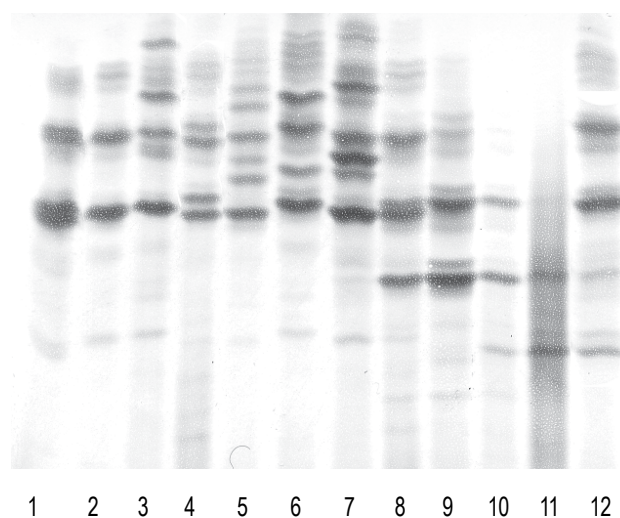


Рисунок 1 Фенотипы A1AT, определяемые методом ИЭФ, слева направо:

1. PiM₂, 2. PiMM, 3. PiMC, 4. PiML, 5. PiMF, 6. PiMI, 7. PiMG, 8. PiMS, 9. PiSS, 10. PiSZ, 11. PiZZ, 12. PiMZ

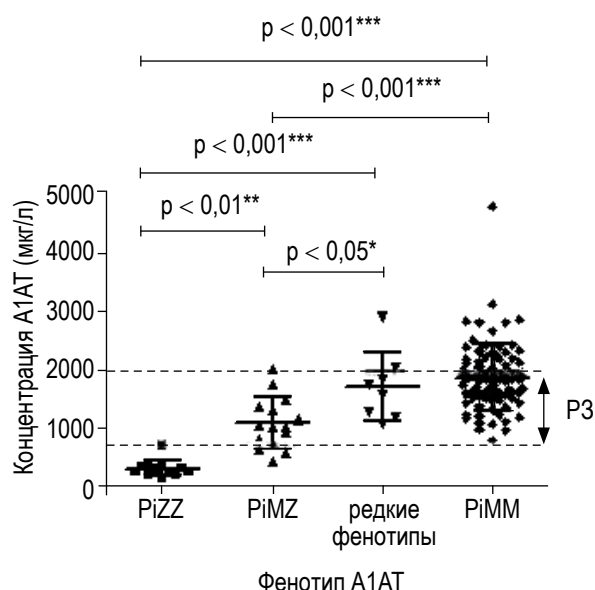


Рисунок 2. Сравнение концентрации A1AT в группах с PiZZ, PiMZ, PiMM и другими редкими фенотипами
Примечание. P3 – референсные значения. Последняя группа включила образцы с 2PiSS-, 2PiMI-, PiML-, PiMF-, PiMC- и PiMG-фенотипами A1AT.

ческом анализаторе A15 (Biosystems, Испания) с помощью реактивов Sentinel (Италия).

Статистический анализ данных проводился с помощью лицензированного программного обеспечения GraphPad Prism 4.0. В зависимости от характера распределения данных были использованы параметрические и непараметрические методы. При сравнении таких показателей, как $IFN\gamma$, $TNF\alpha$, IL-6, IL-8 был использован метод one way analysis of variance (one-way ANOVA). Сравнение содержания IL-17 проводилось методом Краскела–Уоллиса. Различие считалось достоверным при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Проанализировано 86 образцов больных с подозрением на дефицит A1AT, в результате чего были выделены четыре группы с PiMM, PiZZ, PiMZ и редкими фенотипами A1AT. Средняя концентрация A1AT при PiZZ фенотипе составила $316,1 \pm 41,71$ мкг/л ($n = 12$) и была достоверно ниже по сравнению с остальными группами ($p < 0,001$). Средняя концентрация при PiMZ-фенотипе ($1083 \pm 113,4$ мкг/л, $n = 15$) также оказалась снижена по сравнению с группами с PiMM ($1864 \pm 61,22$ мкг/л, $n = 86$, $p < 0,001$) и с другими редкими фенотипами ($1708 \pm 207,1$ мкг/л, $n = 8$, $p < 0,05$) (см. рис. 2).

Среднее содержание лейкоцитов оказалось наиболее высоким в группе с редкими фенотипами A1AT ($16,96 \pm 1,618 \times 10^9$ кл/мкл) и до-

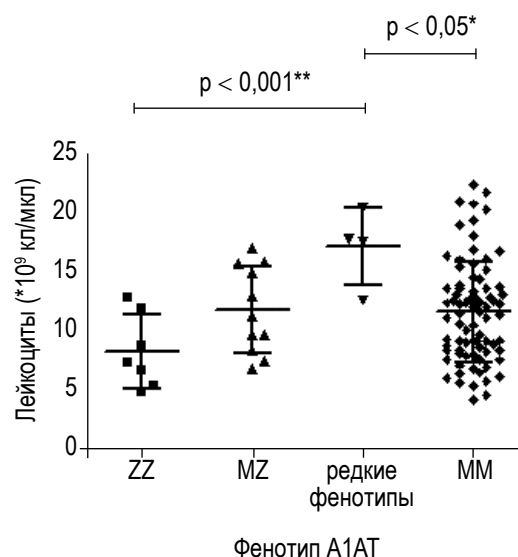


Рисунок 3. Сравнение уровня лейкоцитов при PiZZ, PiMZ, PiMM и редких фенотипах A1AT

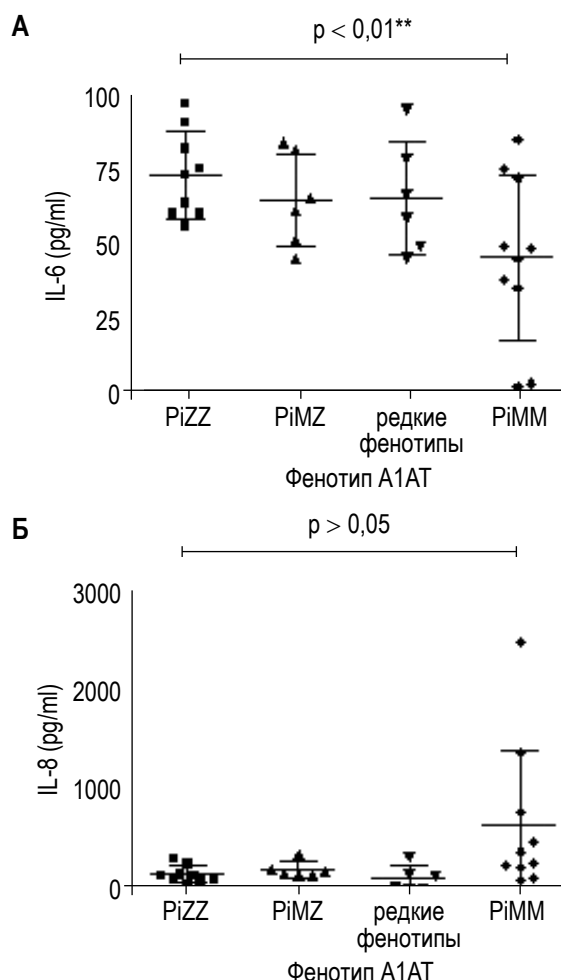


Рисунок 4. А – Сопоставление значений IL-6 при PiZZ, PiMZ, PiMM и редких фенотипах. Б – сопоставление значений IL-8 при PiZZ, PiMZ, PiMM и редких фенотипах

статистически отличалось от средней при PiMM- ($11,49 \pm 0,4807 \times 10^9$ кл/мкл, $n = 79$, $p < 0,05$) и при PiZZ-фенотипе ($8,149 \pm 1,169 \times 10^9$ кл/мкл, $n = 7$, $p < 0,01$) (см. рис. 3).

Уровень IL-6 при PiZZ-фенотипе составил $73,52 \pm 4,363$ pg/ml ($n = 10$) и был повышен по сравнению с PiMM-фенотипом ($45,61 \pm 8,012$ pg/ml, $n = 11$, $p < 0,05$). Статистически значимых изменений уровня IL-8 при различных фенотипах A1AT обнаружено не было. Результаты сравнения концентраций IL-6 и IL-8 при различных фенотипах A1AT представлены на рисунке 4А и Б.

Среднее значение IL-17 оказалось повышено как при PiZZ- ($80,13 \pm 13,56$ pg/ml), так и при PiMZ- ($106,7 \pm 26,28$ pg/ml) фенотипах по сравнению с PiMM-фенотипом: $42,73 \pm 18,52$ pg/ml (тест Краскела–Уоллиса, $p < 0,001$). Результаты сравнения уровня IL-17 при различных фенотипах A1AT представлены на рисунке 5.

Мы не обнаружили статистически значимых различий между уровнем СРБ, СОЭ, фибриногена, TNF α и IFN γ при различных фенотипах A1AT.

Обсуждение

При тканевом воспалении ААТ играет роль регулирующего фактора, влияющего на продукцию провоспалительных цитокинов. Некоторые эффекты ААТ направлены на предотвращение аутоиммунных и других воспалительных заболеваний, которые нередко развиваются при дефиците ААТ [17, 27, 28]. К таким эффектам относят снижение сывороточного уровня нейтрофильных протеаз, которые являются мишенью для аутоантител, ингибирование их высвобождения из гранул под действием TNF α [17] и подавление продукции IL-17 [19].

Мы определили сывороточный уровень IFN γ , TNF α , IL-6, IL-8 и IL-17 в четырех группах с PiMM, PiZZ, PiMZ и редкими фенотипами ААТ.

В группе с PiZZ-фенотипом, сопровождавшимся выраженным количественным дефицитом ААТ, уровень IL-6 и IL-17 оказался достоверно выше, чем при PiMM-фенотипе, при отсутствии повышения содержания лейкоцитов и IL-8. Следует заметить, что при эмфиземе повышается как уровень IL-6, так и IL-17 [29], но именно IL-17 ассоциирован с обострениями ХОБЛ [30], провоцирует гиперреактивность бронхов и резистентность к ГКС [12], связан с отторжением трансплантата легкого у мышей [31] и изучается в качестве мишени для антицитокиновой терапии при различных легочных заболеваниях [30]. Совместное повышение IL-6 и IL-17 в сыворот-

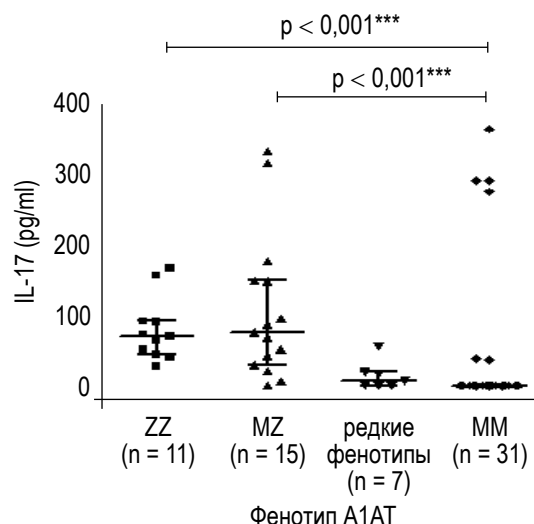


Рисунок 5. Сопоставление значений IL-17 при PiZZ, PiMZ, PiMM и других редких фенотипах, тест Краскела–Уоллиса

ке крови, вероятно, обусловлено синергизмом и взаимной активацией этих двух молекул, при которой IL-6 стимулирует дифференцировку наивных Т-клеток в Th17, продуцирующие IL-17, а IL-17 стимулирует продукцию IL-6 эндотелиоцитами и макрофагами [13]. Избыточная активация IL-8 при дефиците ААТ была неоднократно продемонстрирована *in vitro* [32], однако, *in vivo* повышение содержания IL-8 при ХОБЛ с дефицитом ААТ обнаруживается только в мокроте [20, 33]. Такое локальное повышение уровня IL-8 при системном повышении уровня IL-17 можно частично объяснить тем, что IL-17 из кровотока стимулирует местную продукцию IL-8 клетками дыхательных путей [34]. Некоторые эффекты цитокинов, регулируемые ААТ, представлены на рисунке 6 (см. 2-ю стр. обложки).

Уровень IL-17 был также повышен при PiMZ-фенотипе, что может объяснять повышенную встречаемость PiMZ-фенотипа при аутоиммунных и других воспалительных заболеваниях, в связи с чем PiMZ-фенотип ААТ можно рассматривать как дополнительный фактор риска.

В группе с редкими фенотипами ААТ концентрация ААТ оказалась в пределах РЗ и был обнаружен более высокий уровень лейкоцитов, чем при всех остальных фенотипах, однако, нам не удалось выявить статистически достоверных закономерностей в уровне цитокинов.

Таким образом, профиль провоспалительных цитокинов отличается у больных с различными фенотипами ААТ, что может играть важную роль в развитии ассоциированных с дефицитом ААТ заболеваний.

Список литературы / References

1. Шевченко О.П. Белки острой фазы воспаления. Лаборатория, 1996, № 1. С. 10-17. [Shevchenko O.P. Acute phase proteins. *Laboratoriya = Laboratory*, 1996, no. 1, pp. 10-17. (In Russ.)]
2. Stoller J.K., Lacbawan F.L., Aboussouan L.S. Alpha-1 antitrypsin deficiency. *Gene reviews*, 2006.
3. Lockett A.D., van Demark M., Gu Y., Schweitzer K.S., Sigua N., Kamocki K., Fijalkowska I., Garrison J., Fisher A.J., Serban K., Wise R.A., Flotte T.R., Mueller C., Presson R.G.Jr., Petrache H.I., Tudor R.M., Petrache I. Effect of cigarette smoke exposure and structural modifications on the alpha-1 Antitrypsin interaction with caspases. *Mol. Med.*, 2012, Vol. 18, pp. 445-454.
4. Feng Y., Xu J., Zhou Q., Wang R., Liu N., Wu Y., Yuan H., Che H. Alpha-1 Antitrypsin prevents the development of preeclampsia through suppression of oxidative stress. *Front Physiol.*, 2016, Vol. 7, p. 176.
5. Stockley R.A. The multiple facets of alpha-1-antitrypsin. *Ann. Transl. Med.*, 2015, Vol. 3, no. 10, p. 130.
6. Zampronio A.R., Soares D.M., Souza G.E. Central mediators involved in the febrile response: effects of antipyretic drugs. *Temperature (Austin)*, 2015, Vol. 2, no. 4, pp. 506-521.
7. Koo J.B., Han J.S. Cigarette smoke extract-induced interleukin-6 expression is regulated by phospholipase D1 in human bronchial epithelial cells. *J. Toxicol. Sci.*, 2016, Vol. 41, no. 1, pp. 77-89.
8. de Carvalho F.O., Felipe F.A., de Melo Costa A.C., Teixeira L.G., Silva É.R., Nunes P.S., Shanmugam S., de Lucca Junior W., Quintans J.S., de Souza Araújo A.A. Inflammatory mediators and oxidative stress in animals subjected to smoke inhalation: a systematic review. *Lung*, 2016.
9. Ansarin K., Rashidi F., Namdar H., Ghaffari M., Sharifi A. Echocardiographic evaluation of the relationship between inflammatory factors (IL6, TNFalpha, hs-CRP) and secondary pulmonary hypertension in patients with COPD. A Cross Sectional Study. *Pneumologia*, 2015, Vol. 64, no. 3, pp. 31-35.
10. Chen Z., Shao X., Dou X., Zhang X., Wang Y., Zhu C., Hao C., Fan M., Ji W., Yan Y. Role of the mycoplasma pneumoniae/interleukin-8/neutrophil axis in the pathogenesis of pneumonia. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 1, p. e0146377.
11. Majak P. Tumor necrosis factor alpha as an asthma biomarker in early childhood. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2016, Vol. 84, no. 3, pp. 143-144.
12. Cosmi L., Liotta F., Annunziato F. Th17 regulating lower airway disease. *Curr Opin Allergy Clin. Immunol.*, 2016, Vol. 16, no. 1, pp. 1-6.
13. Miossec P., Korn T., Kuchroo V.K. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N. Engl. J. Med.*, 2009, Vol. 361, no. 9, pp. 888-898.
14. Ortiz G., Salica J.P., Chuluyan E.H., Gallo J.E. Diabetic retinopathy: could the alpha-1 antitrypsin be a therapeutic option? *Biol. Res.*, 2014, Vol. 47, p. 58.
15. Lewis E.C., Shapiro L., Bowers O.J., Dinarello C.A. Alpha1-antitrypsin monotherapy prolongs islet allograft survival in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2005, Vol. 102, no. 34, pp. 12153-12158.
16. Subramaniam D., Virtala R., Pawłowski K., Clausen I.G., Warkentin S., Stevens T., Janciauskiene S. TNF-alpha-induced self expression in human lung endothelial cells is inhibited by native and oxidized alpha1-antitrypsin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2008, Vol. 40, no. 2, pp. 258-271.
17. Bergin D.A., Reeves E.P., Hurley K., Wolfe R., Jameel R., Fitzgerald S., McElvaney N.G. The circulating proteinase inhibitor alpha-1 antitrypsin regulates neutrophil degranulation and autoimmunity. *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, no. 217, p. 217ra1.
18. Pott G.B., Chan E.D., Dinarello C.A., Shapiro L. Alpha-1-antitrypsin is an endogenous inhibitor of proinflammatory cytokine production in whole blood. *J. Leukoc. Biol.*, 2009, Vol. 85, no. 5, pp. 886-895.
19. Subramanian S., Shahaf G., Ozeri E., Miller L.M., Vandenbark A.A., Lewis E.C., Offner H. Sustained expression of circulating human alpha-1 antitrypsin reduces inflammation, increases CD4⁺FoxP3⁺ Treg cell population and prevents signs of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Metab. Brain Dis.*, 2011, Vol. 26, no. 2, pp. 107-113.
20. Stone H., McNab G., Wood A.M., Stockley R.A., Sapey E. Variability of sputum inflammatory mediators in COPD and alpha1-antitrypsin deficiency. *Eur. Respir. J.*, 2012, Vol. 40, no. 3, pp. 561-569.
21. Seixas S., Garcia O., Trovoada M.J., Santos M.T., Amorim A., Rocha J. Patterns of haplotype diversity within the serpin gene cluster at 14q32.1: insights into the natural history of the alpha1-antitrypsin polymorphism. *Hum. Genet.*, 2001, Vol. 108, no. 1, pp. 20-30.

22. Keren D.F. Protein electrophoresis in clinical diagnosis. Ed. A. London, 2003, pp. 71-77.
23. Salahuddin P. Genetic variants of alpha1-antitrypsin. *Curr. Protein Pept. Sci.*, 2010, Vol. 11, no. 2, pp. 101-117.
24. Olfert I.M., Malek M.H., Eagan T.M., Wagner H., Wagner P.D. Inflammatory cytokine response to exercise in alpha-1-antitrypsin deficient COPD patients 'on' or 'off' augmentation therapy. *BMC Pulm. Med.*, 2014, Vol. 14, p. 106.
25. Pervakova M.Yu., Emanuel V.L., Titova O.N., Lapin S.V., Mazurov V.I., Belyaeva I.B., Chudinov A.L., Blinova T.V., Surkova E.A. The diagnostic value of alpha-1-antitrypsin phenotype in Patients with granulomatosis with polyangiitis. *International Journal of Rheumatology*, 2016, pp. 1-5.
26. Pervakova M.Y., Emanuel V.L., Surkova E.A., Mazing A.V., Lapin S.V., Kovaleva I.S., Sysoeva S.N. The comparison of techniques of electrophoresis, immune turbidynamic measurement and phenotyping of alpha-1-antitrypsin for diagnostic of alpha-1-antitrypsin insufficiency. *Clin. Lab. Diagn.*, 2015, Vol. 10, pp. 28-32.
27. Mahr A.D., Edberg J.C., Stone J.H., Hoffman G.S., St Clair E.W., Specks U., Dellaripa P.F., Seo P., Spiera R.F., Rouhani F.N., Brantly M.L., Merkel P.A. Alpha(1)-antitrypsin deficiency-related alleles Z and S and the risk of Wegener's granulomatosis. *Arthritis Rheum.*, 2010, Vol. 62, no. 12, pp. 3760-3767.
28. American Thoracic Society/European Respiratory Society statement: standards for the diagnosis and management of individuals with alpha-1 antitrypsin deficiency. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003, Vol. 168, no. 7, pp. 818-900.
29. Duan M.C., Zhang J.Q., Liang Y., Liu G.N., Xiao J., Tang H.J., Liang Y. Infiltration of IL-17-producing T cells and Treg cells in a mouse model of smoke-induced emphysema. *Inflammation*, 2016.
30. Singh D. Chronic Obstructive Pulmonary Disease, Neutrophils and Bacterial Infection: A complex web involving IL-17 and IL-22 unravels. *EBioMedicine*, 2015, Vol. 2, no. 11, pp. 1580-1581.
31. Chen Q.R., Wang L.F., Xia S.S., Zhang Y.M., Xu J.N., Li H., Ding Y.Z. Role of interleukin-17A in early graft rejection after orthotopic lung transplantation in mice. *J. Thorac. Dis.*, 2016, Vol. 8, no. 6, pp. 1069-1079.
32. Bergin D.A., Reeves E.P., Meleady P., Henry M., McElvaney O.J., Carroll T.P., Condron C., Chotirmall S.H., Clynes M., O'Neill S.J., McElvaney N.G. Alpha-1 Antitrypsin regulates human neutrophil chemotaxis induced by soluble immune complexes and IL-8. *J Clin. Invest.*, 2010, Vol. 120, no. 12, pp. 4236-4250.
33. Aldonyte R., Eriksson S., Piitulainen E., Wallmark A., Janciauskiene S. Analysis of systemic biomarkers in COPD patients. *COPD*, 2004, Vol. 1, no. 2, pp. 155-164.
34. Honda K., Wada H., Nakamura M., Nakamoto K., Inui T., Sada M., Koide T., Takata S., Yokoyama T., Saraya T., Kurai D., Ishii H., Goto H., Takizawa H. IL-17A synergistically stimulates TNF-alpha-induced IL-8 production in human airway epithelial cells: A potential role in amplifying airway inflammation. *Exp. Lung. Res.*, 2016, Vol. 42, no. 4, pp. 205-216.

Авторы:

Первакова М.Ю. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Лалин С.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, заведующий лабораторией диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Pervakova M.Yu., Laboratory Doctor, Diagnostic Laboratory for Autoimmune Disorders, Research Center of Molecular Medicine, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Lapin S.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Head, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Research Center of Molecular Medicine, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Суркова Е.А. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Ткаченко О.Ю. — лаборант, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

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

Гусева В.И. — лаборант, лаборатория диагностики аутоиммунных заболеваний НМЦ по молекулярной медицине ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Титова О.Н. — д.м.н., профессор, директор НИИ пульмонологии ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Эмануэль В.Л. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой клинической лабораторной диагностики с курсом молекулярной медицины ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Тотolian Арег А. — д.м.н., член-корр. РАН, профессор, директор Санкт-Петербургского научно-исследовательского института эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Surkova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Research Center of Molecular Medicine, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Tkachenko O.Yu., Laboratory Assistant, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Research Center of Molecular Medicine, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Guseva V.I., Laboratory Assistant, Laboratory for Diagnostics of Autoimmune Diseases, Research Center of Molecular Medicine, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Titova O.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute of Pulmonology, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Emanuel V.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course of Molecular Medicine, The First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Totolian Areg A., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Director, St. Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russian Federation; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 14.07.2016
Отправлена на доработку 29.08.2016
Принята к печати 01.09.2016

Received 14.07.2016
Revision received 29.08.2016
Accepted 01.09.2016

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЛАКТОБАЦИЛЛ В КАЧЕСТВЕ АДЬЮВАНТОВ ПРИ ИНТРАНАЗАЛЬНОЙ ИММУНИЗАЦИИ ХИМЕРНОЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНОЙ

Леонтьева Г.Ф.¹, Крамская Т.А.¹, Грабовская К.Б.¹,
Филимонова В.Ю.¹, Лайно Д.², Виллена Д.², Альварес С.²,
Даниленко В.Н.³, Суворов А.Н.^{1,4}

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

² Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина

³ ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия

⁴ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Одной из наиболее актуальных задач медико-биологической науки является создание вакцинных препаратов против патогенных стрептококков — самых распространенных бактериальных возбудителей заболеваний человека, экономический ущерб от которых уступает лишь потерям от гриппозной инфекции. Входными воротами стрептококковой инфекции являются слизистые оболочки респираторного и мочеполового тракта.

Парентеральный способ введения вакцин не всегда позволяет добиваться одинаково эффективной стимуляции местного иммунитета на слизистых оболочках, а вакцины, вводимые через слизистые оболочки, способны эффективно стимулировать иммунную защиту в области введения, а также обеспечить развитие системного иммунного ответа.

Введение через слизистые оболочки вакцинных препаратов белковой природы требует использования специальных эффективных и безопасных адъювантов, поскольку рекомбинантные белки обычно проявляют недостаточную иммуногенность при таком способе введения. В работе в качестве вакцинных адъювантов при мукозальной иммунизации лабораторных животных пневмококковыми химерными рекомбинантными белками PSPF и PSP были апробированы два штамма пробиотиков — *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 и L32. Рекомбинантные химерные белки PSPF и PSP несут в своей структуре несколько иммуногенных эпитопов PspA, Spr1875, PsaA и предназначены для вакцинации против инфекции *Streptococcus pneumoniae*. Белки, отличие которых связано с присутствием в структуре PSPF участка молекулы флагеллина — FliC, по-разному стимулировали иммунный ответ при совместном введении с двумя штаммами пробиотиков. Установлено, что оба исследованных штамма *L. rhamnosus* были способны оказывать адъювантный эффект при интраназальном введении вакцинных белков, проявлявшийся в усилении секреторного и гуморального иммунного ответа на совместно введенный рекомбинантный химерный белок PSPF. Выраженной стимуляции продукции специфических IgA носовых смывов и IgG сыворотки крови на PSP под влиянием *L. rhamnosus* L32 не происходило. Адъювантный эффект от вводимых лактобациллярных препаратов существенно снижался после температурной инактивации бактерий, однако препарат клеточных стенок *L. rhamnosus* CRL1505 проявлял выраженную активность. Стимуляция иммунного ответа адъювантами приводила к усилению протективного эффекта вакцины в экспериментах на лабораторных животных, инфицированных *S. pneumoniae*.

Адрес для переписки:

Леонтьева Галина Федоровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»,
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-74.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Address for correspondence:

Leontieva Galina F.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str, 12.
Phone: 7 (812) 234-68-74.
E-mail: galeonte@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.Ф. Леонтьева, Т.А. Крамская, К.Б. Грабовская,
В.Ю. Филимонова, Д. Лайно, Д. Виллена, С. Альварес,
В.Н. Даниленко, А.Н. Суворов «Использование лактобацилл
в качестве адъювантов при интраназальной иммунизации
химерной пневмококковой вакциной» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 545–554.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-545-554

For citation:

G.F. Leontieva, T.A. Kramskaya, K.B. Grabovskaya,
V.Yu. Filimonova, J. Lairio, J. Villena, S. Alvares, V.N. Danilenko,
A.N. Suvorov “Evaluation of *Lactobacillus* probiotics as adjuvants
for nasal immunization with chimeric pneumococcal vaccine”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 6, pp. 545–554.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-545-554

Установлено, что некоторые штаммы лактобацилл, в частности *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 и L32, могут быть использованы в качестве адъювантов в составе мукозальных вакцин, однако эта способность зависит от свойств вакцинного препарата и формы введения пробиотиков.

Ключевые слова: лактобациллы, пробиотики, рекомбинантные белки, мукозальные вакцины, адъюванты, пневмококковая инфекция

EVALUATION OF *LACTOBACILLUS* PROBIOTICS AS ADJUVANTS FOR NASAL IMMUNIZATION WITH CHIMERIC PNEUMOCOCCAL VACCINE

Leontieva G.F.^a, Kramskaya T.A.^a, Grabovskaya K.B.^a, Filimonova V.Yu.^a, Laino J.^b, Villena J.^b, Alvares S.^b, Danilenko V.N.^c, Suvorov A.N.^{a, d}

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

^b Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

^c Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Abstract. Vaccine protection against pathogenic gram-positive bacteria including different species of streptococci is an important problem of contemporary molecular biology. Streptococcal infections are most common bacterial infections surpassing by the economic losses all the infections excluding influenza. The gates of streptococcal infection, oral cavity or vagina, are covered with immune and non-immune mucosal cells that are the first line of defenses. Subcutaneous immunization not always stimulates the local immunity on mucosal surfaces. On the other hand, mucosal vaccination can provide an appropriate local immune response together with systemic protection. However, mucosal immunization often requires usage of special and effective adjuvants especially in case of vaccines based on recombinant proteins.

For protection against *Streptococcus pneumoniae* infection, two chimeric recombinant proteins (PSPF and PSP) have been tested as vaccines. Recombinant proteins PSPF and PSP carry immunogenic epitopes from the respiratory pathogen including PspA, Spr1875 and PsaA. PSPF structure also carries a fraction of flagellin-FliC molecule in comparison with PSP, which does not have this fragment. This portion of PSPF was included as internal adjuvant intended for the stimulation of Toll-like receptor 5.

In this work, the adjuvant capacity of two probiotic strains, *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and *L. rhamnosus* L32 was evaluated. It was demonstrated that both lactic acid bacteria strains were able to provide adjuvant effects by enhancing the mucosal and systemic immune responses after their co-administration with the recombinant chimeric protein PSPF. The adjuvant effect of both *Lactobacillus* strains was significantly decreased after their thermal inactivation. However, the cell walls of bacteria showed a marked adjuvant activity. An improved protection against several *S. pneumoniae* serotypes after mucosal immunization of infant mice with PSPF vaccine with probiotic strains or their cell walls was also demonstrated here.

The recombinant chimeric protein PSPF administered with immunomodulatory probiotic strains or their bacterial components would be a promising vaccine for immunization of humans against *S. pneumoniae*, particularly in children.

Keywords: *Lactobacillus*, probiotics, recombinant proteins, mucosal vaccines, adjuvants, pneumococcal infection

Исследование выполнялось на средства субсидии из федерального бюджета в рамках соглашения № 14.613.21.0023.

Введение

Вакцинация с момента своего введения в медицинскую практику и по настоящее время является действенным средством снижения заболеваемости и смертности от инфекций. Прогресс в развитии современной биологии и медицины, связанный с появлением современных молекулярно-генетических технологий, способствует

разработке новых типов вакцин, эффективных в отношении широко распространенных опасных инфекционных заболеваний. В настоящее время создаются новые формы вакцинных препаратов, апробируются разнообразные адъюванты и пути введения препарата, способные обеспечить оптимальный иммунный ответ и высокую протективную эффективность вакцинации.

Одной из наиболее актуальных задач медико-биологической науки является создание вакцинных препаратов против патогенных стрептококков — самых распространенных бактериальных

возбудителей заболеваний человека, экономический ущерб от которых уступает лишь потерям от гриппозной инфекции. Входными воротами стрептококковой инфекции являются слизистые оболочки респираторного и мочеполового тракта. Очевидно, что одновременная индукция местного и системного иммунного ответа способствует повышению эффективности процесса вакцинации. Парентеральный способ введения вакцин не всегда позволяет добиваться одинаково эффективной стимуляции местного иммунитета на слизистых оболочках различных анатомических зон [8]. Вакцины, вводимые через слизистые оболочки, способны эффективно стимулировать иммунную защиту в области введения, а также обеспечить развитие системного иммунного ответа [17].

Введение через слизистые оболочки вакцинных препаратов белковой природы требует использования специальных эффективных и безопасных адъювантов, поскольку рекомбинантные белки обычно проявляют недостаточную иммуногенность при таком способе введения [6].

В последние годы выявлена способность различных пробиотических штаммов лактобацилл стимулировать реакции врожденного иммунитета [12] и оказывать влияние на формирование адаптивного иммунного ответа.

В настоящей работе исследована возможность применения пробиотических штаммов *Lactobacillus rhamnosus* в качестве адъювантов в составе рекомбинантных химерных вакцин против *Streptococcus pneumoniae*.

Материалы и методы

Микроорганизмы

Штамм *Lactobacillus rhamnosus* L32 получен из коллекции отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «ИЭМ», штамм CRL1505 предоставлен CERELA culture collection (Chacabuco 145, San Miguel de Tucumán, Argentina). Бактерии культивировали в среде MRS в течение 24 часов при 37 °С (суточная культура) в анаэробных условиях, отмывали трехкратно центрифугированием при 3000 об/мин в течение 10 минут и концентрировали в 10 раз.

Термоинактивацию бактерий проводили при 80 °С в течение 30 минут.

Для дезинтеграции и получения компонентов клеточной стенки бактерии разрушали с помощью ультразвука (четырёхкратное озвучивание, время озвучивания — 5 мин, время паузы между импульсами — 60 с, амплитуда — 9 мкм). После разрушения лизат осветляли центрифугированием в течение 20 минут при 3000 об/мин на холо-

де, компоненты бактериальных клеток осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 1 часа при охлаждении. Осадок промывали в том же режиме и ресуспендировали в стерильном физиологическом растворе.

Об эффективности термоинактивации и дезинтеграции судили по результатам высева материала на плотную ростовую среду MRS агара (HIMEDIA, Индия). Отсутствие роста подтверждало полноту разрушения бактериальных клеток.

Подготовку всех вариантов адъюванта проводили из одной и той же суспензии бактерий. Одна доза живых бактерий составила 10⁸ КОЕ/мышь. Одна доза термоинактивированного варианта пробиотика содержала равное количество бактерий. Компоненты стенок бактериальных клеток, полученные из общей бактериальной взвеси, ресуспендировали в физиологическом растворе до исходного объема и далее в соответствии с конечным разведением живой культуры пробиотика.

Штаммы *Streptococcus pneumoniae* 3, 6B, 14, 19F серотипов получали из коллекции Института детских инфекций, Санкт-Петербург. Бактерии культивировали в среде ТХБ (HIMEDIA, Индия) с 20% сыворотки лошади (Биолот, Россия) в течение 24 часов при +37 °С в анаэробных условиях, отмывали PBS трехкратным центрифугированием при 3500 об/мин в течение 20 минут.

Животные

Исследования проводили на беспородных мышах (самки, возраст 10 недель), полученных из питомника лабораторных животных «Рапполово». Мыши albano Swiss (самки, возраст 3 недели) предоставлены Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina.

Вакцинные препараты

В работе использованы два белковых химерных рекомбинантных вакцинных препарата — PSPF и PSP-гибридные молекулы, составленные из линейно соединенных иммунодоминантных фрагментов нескольких поверхностных белков патогенных пневмококков. Молекулы первоначально моделировании сначала *in silico*, на компьютере, а затем в лаборатории с применением технологии, включающей химический синтез полноразмерной ДНК молекулы, ее клонирование в экспрессионных векторах с последующей экспрессией белков в эффективных продуцентах [21].

Компьютерное моделирование было осуществлено с помощью пакетов компьютерных программ BLAST (NCBI) ExPASy и алгоритма I-Tasser CASPs (Critical Assessment of protein Structure Prediction) с целью создания реалисти-

ческих моделей белков. Для объединения доменов был осуществлен докинг эпитопных детерминант. Все рекомбинантные белки выделяли и очищали методом аффинной хроматографии на колонке с Ni-сефарозой (GE Healthcare, Швеция) согласно процедуре, рекомендованной производителем.

Чистоту и количественное содержание белка контролировали с помощью электрофореза в 10 % полиакриламидном геле (ПААГ) в вертикальном пластинчатом аппарате Mini-PROTEAN II (BioRad, США) и методом Лоури соответственно. Уровень содержания ЛПС определяли с помощью ЛАЛ-теста.

Аранжировка эксперимента

В экспериментах по оценке адъювантного эффекта *Lactobacillus rhamnosus* L32 живые, термоинактивированные и дезинтегрированные бактерии вводили четыре раза. В первый день животные получали только пробиотические адъюванты или физиологический раствор. Во второй день проводили иммунизацию смесью адъюванта и химерных белков в дозе 20 мкг/мышь. Через 21 день после первого введения процедуру повторяли в той же последовательности. Исследуемые препараты вводили интраназально под легким эфирным наркозом, объем материала был равен 0,05 мл. Последовательность манипуляций схематически представлена на рисунке 1А.

В экспериментах по оценке адъювантного эффекта *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 термоинактивированную форму бактерий и их клеточные стенки вводили интраназально в смеси с по-

липептидом PSPF в дозе 20 мкг/мышь трижды с интервалом в две недели. Последовательность манипуляций схематически представлена на рисунке 1Б.

Забор крови

Образцы крови от каждого животного собирали в указанные выше сроки из подчелюстной вены. Образцы сыворотки замораживали и хранили при -80 °С.

Получение смывов

Для определения специфических секреторных IgA мышам внутрибрюшинно вводили 0,1 мл 0,5% раствора пилокарпина и через 1-2 минуты собирали 50 мкл секретов непосредственно сразу после начала повышенного слюноотделения. В пробы вносили ингибитор протеаз PMSF до конечной концентрации 1 mM.

Исследуемые специфические антитела и средства их оценки

Содержание специфических IgM, IgG, IgA определяли в ИФА с использованием конъюгатов соответствующих козьих антимышиных антител (Sigma, США).

Статистический анализ

Эксперименты были выполнены в трех повторях. Результаты представлены в виде средних значений и соответствующих им стандартных отклонений. Данные обрабатывали с использованием пакета программ анализа данных в Excel (однофакторный дисперсионный анализ, описательная статистика). Отличия считались статистически достоверными при $p < 0,05$.

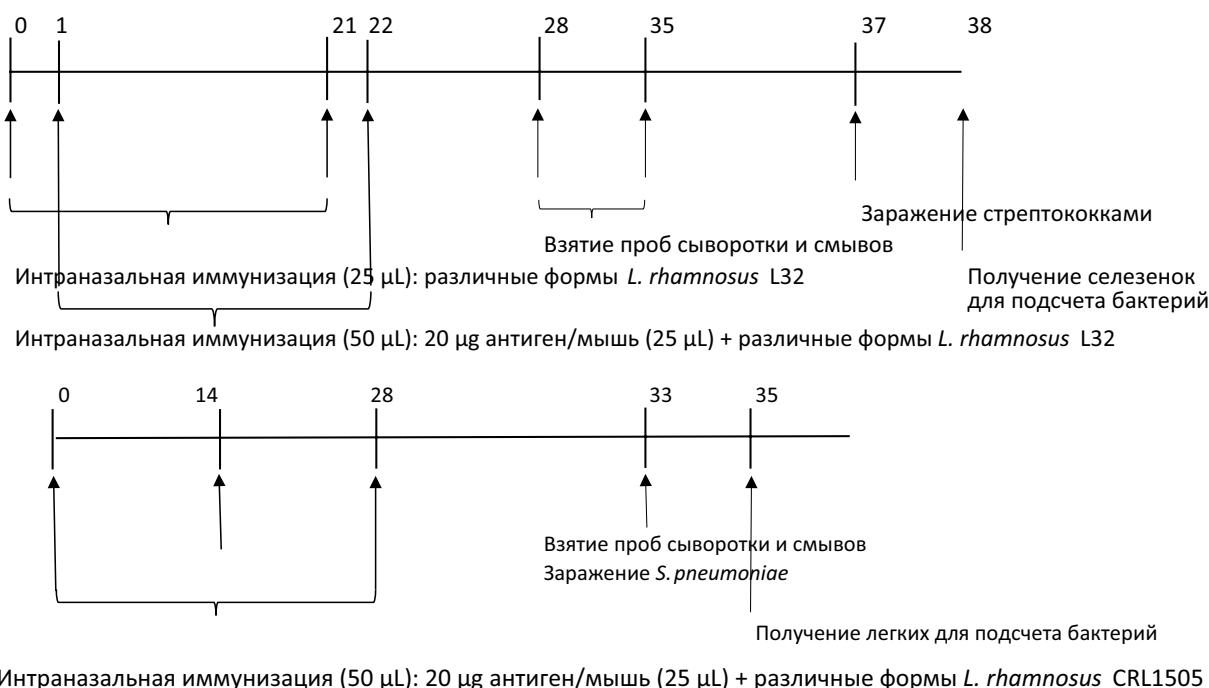


Рисунок 1. Схема постановки эксперимента

Результаты

Изучение адъювантных свойств *L. rhamnosus* CRL1505

Адъювантный потенциал пробиотического штамма CRL1505 изучали в отношении химерного белка PSPF. Мыши линии Swiss в возрасте 3 недель были трехкратно иммунизированы интраназально свободным полипептидом, а также его смесью с термоинактивированным пробиотиком или клеточными стенками бактерий в соответствии со схемой эксперимента (рис. 1А). Установлено, что клеточные стенки пробиотического штамма *L. rhamnosus* CRL1505 проявляли выраженный адъювантный эффект и достоверно стимулировали продукцию специфических сывороточных IgM и IgG, а также IgA и IgG бронхоальвеолярных смывов в отличие от термоинактивированной формы лактобацилл, которая достоверно повышала только концентрацию PSPF-специфических IgM (рис. 2).

Протективный потенциал иммунного ответа соответствовал уровню иммунной реакции на специфический антиген. Процесс выведения из легких *S. pneumoniae* всех четырех исследованных серотипов был более интенсивным в группе, иммунизированной белком PSPF совместно с клеточными стенками пробиотика. На момент контроля протективности количество пневмококка в легких животных из этой группы было самым низким, а отличия от других групп достоверны (рис. 3).

Изучение адъювантных свойств *L. rhamnosus* L32

Иммуномодулирующие свойства пробиотического штамма *L. rhamnosus* L32 в отношении белков PSPF и PSP исследовали на модели беспородных мышей по схеме, указанной на рисунке 1Б. В процессе развития иммунного ответа на двукратную интраназальную вакцинацию проводили сравнительный анализ содержания антигенспецифических антител классов А и G в носовых смывах и сыворотках животных. Рекомбинантные химерные вакцинные препараты PSPF, PSP вводили индивидуально или совместно с различными формами пробиотика.

Установлено, что совместное использование живой культуры *L. rhamnosus* L32 и белка PSPF приводило к стимуляции уровня специфических IgA и IgG антител. После повторной вакцинации средние показатели концентрации сывороточных IgG в группе животных, получавших пробиотик, достоверно превышали показатели в контрольной группе без пробиотика. Под влиянием живого пробиотического штамма происходило ускоренное накопление секреторных антител

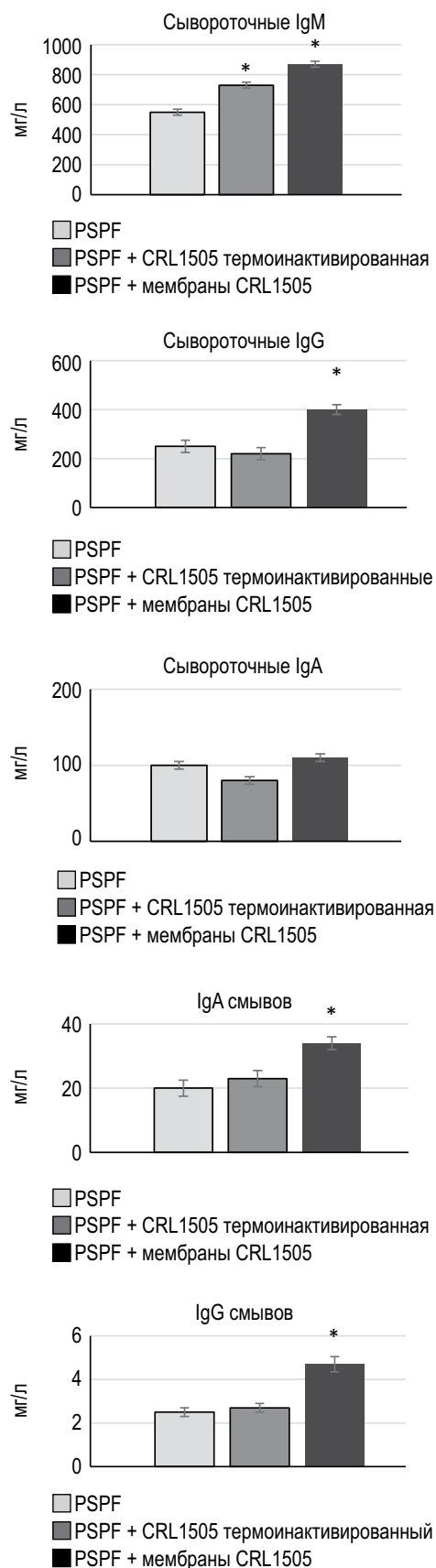


Рисунок 2. Иммунный ответ на вакцинацию белком PSPF совместно с *L. rhamnosus* CRL1505

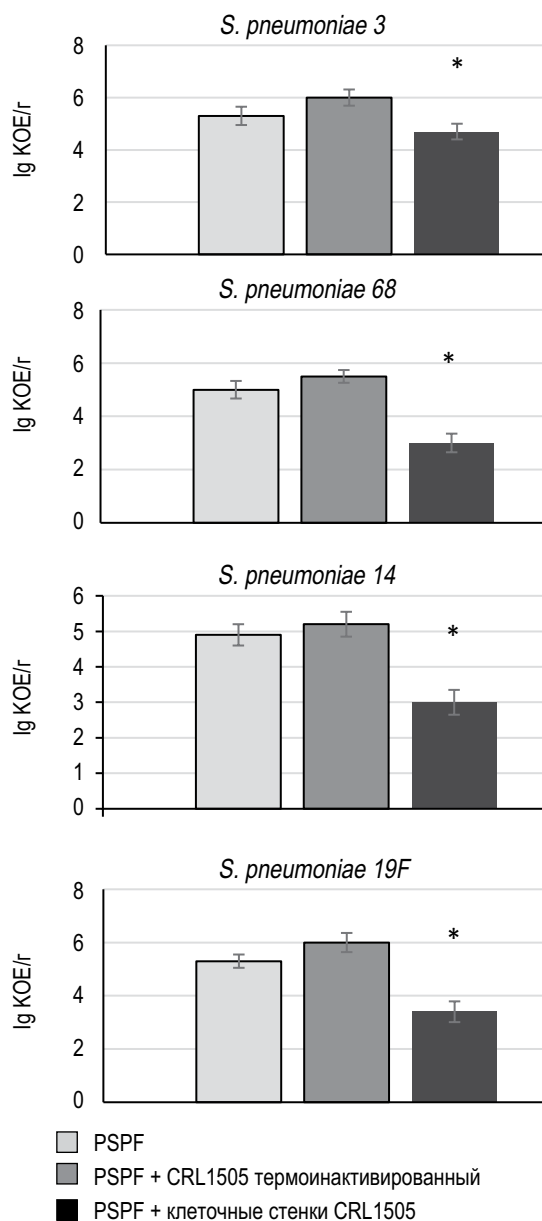


Рисунок 3. Содержание *S. pneumoniae* в легких мышей, иммунизированных белком PSPF совместно с *L. rhamnosus* CRL1505, через 48 часов после инфекции

Примечание. * – отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$.

в носовых смывах, что было зарегистрировано на 28 и 35 день от начала эксперимента (рис. 4А).

Термоинактивация *L. rhamnosus* L32 полностью устраняла адъювантный эффект в отношении IgG антител. В группе животных, вакцинированных пробиотиком после его дезинтеграции ультразвуком, отмечена тенденция к повышению средних показателей концентрации специфических IgG. В отношении секреторного иммунного ответа как термоинактивированная, так и дезинтегрированная форма *L. rhamnosus* L32 обеспечи-

вали превышение средних показателей на протяжении всего срока наблюдения.

В отношении белка PSP адъювантный эффект живой культуры *L. rhamnosus* L32 не проявился, средние показатели секреторного и гуморального иммунного ответа в контрольной и опытной группе практически не отличались (рис. 4Б).

Сравнение уровня протективной эффективности иммунитета, стимулированного вакцинацией мышей белками PSPF и PSP в свободной форме и в присутствии пробиотического адъюванта, проводили на модели пневмококковой инфекции у мышей после внутрибрюшинного заражения штаммом 73 *S. pneumoniae* (рис. 5А).

Через 24 часа после заражения оценивали содержание бактерий в селезенках инфицированных животных. Установлено, что в группе мышей, вакцинированных PSPF в присутствии живой и дезинтегрированной пробиотической культуры, наблюдалось ускоренное выведение бактерий из организма по сравнению с контрольными мышами, вакцинированными в отсутствие адъюванта. Термоинактивированный вариант пробиотического штамма не способствовал повышению устойчивости к инфекции.

Пневмококковая инфекция у мышей, иммунизированных PSP в свободной форме и в сочетании с живым пробиотическим штаммом L32, протекала одинаково. Количество бактерий в селезенке через 24 часа от начала инфекции практически не отличалось (рис. 5Б).

Обсуждение

Пневмококковая инфекция, приводящая к развитию большинства бактериальных пневмоний и острых отитов у детей, входит в число наиболее острых проблем здравоохранения во всех странах мира. Несмотря на успехи антибиотикотерапии, средств диагностики и профилактики заболеваний, показатели смертности от пневмококковых заболеваний остаются высокими.

Полисахаридные и конъюгированные пневмококковые вакцины, имеющиеся на рынке вакцинных препаратов, не могут обеспечить необходимой эффективности профилактических мероприятий из-за присущих им недостатков, связанных со спецификой иммунного ответа к полисахаридным антигенам и ограниченностью антигенного состава существующих вариантов. В настоящее время выявлено около 100 различных серотипов пневмококков, причем их распределение в разных странах варьирует в зависимости от антигенного состава наиболее широко используемой вакцины. На мировом рынке

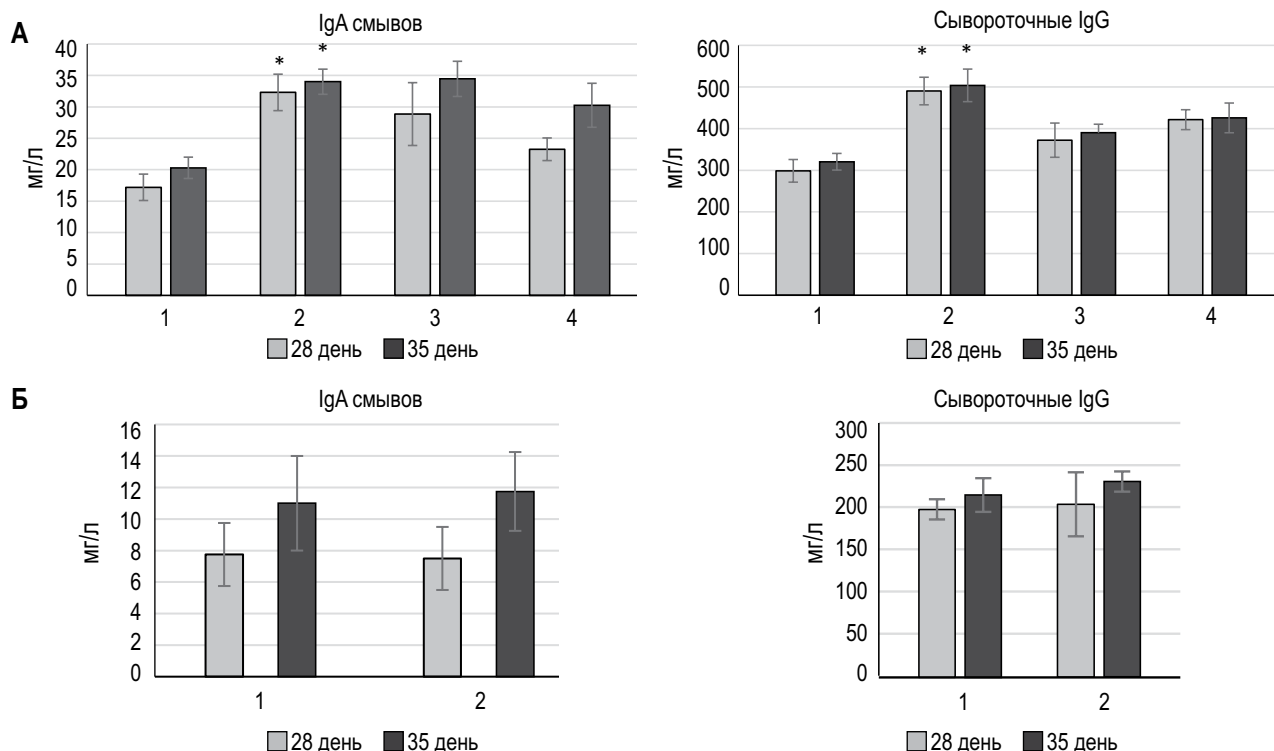


Рисунок 4. Иммунный ответ на вакцинацию белками PSPF (А) и PSP (Б) совместно с *L. rhamnosus* L32.

Примечание. Вакцинный препарат содержал: 1 – белок без адъюванта; 2 – белок и живую форму L32; 3 – белок и термоинактивированный L32; 4 – белок и клеточные стенки L32; * – отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$.

выпускаются четыре пневмококковые вакцины: 23-валентная полисахаридная, доступная с 1980 года и конъюгированные 7, 10 и 13-валентные, которые присутствуют на рынке с 2009 года, причем первая из них постепенно теряет популярность в силу нестойкости иммунитета [2]. В связи с необходимостью качественного усовершенствования вакцин и расширения их количества в 2001 году в рамках инициативы ВОЗ (IVR) были приняты специальные программы содействия различным проектам в области исследований и разработки вакцин против инфекционных болезней, имеющих наибольшую значимость для общественного здравоохранения [25]. С развитием молекулярных технологий в последнее время появилась возможность конструирования рекомбинантных вакцин на основе поверхностных бактериальных белков. Преимуществом такого рода вакцин является существенно более длительный иммунитет и консерватизм поверхностных белковых антигенов.

Исследованные в работе вакцинные препараты – белки PSPF и PSP – представляют собой рекомбинантные химерные молекулы, которые составлены из последовательно соединенных фрагментов нескольких поверхностных белков *S. pneumoniae*. Молекулы рекомбинантных бел-

ков первоначально моделировали *in silico*, а затем получали экспериментально с применением технологии, включающей химический синтез полноразмерной ДНК-молекулы, ее клонирование в экспрессионных векторах с последующей экспрессией белков в эффективных продуцентах [21].

Проектирование химерных конструкций проводилось на основе результатов собственных экспериментальных исследований рекомбинантных аналогов ряда поверхностных белков патогенных стрептококков [3, 20, 24].

Аминокислотную последовательность белков PSPF и PSP составляют иммунодоминантные фрагменты поверхностных белков *S. pneumoniae* – PsaA, PspA and Spr1875, а в состав PSPF входят С- и N-концевые фрагменты флагеллина. Ранее было показано, что химерные белки иммуногенны, а специфический иммунный ответ обеспечивает защиту от пневмококковой инфекции [21].

Входными воротами инфекций, вызываемых многими патогенными бактериями, является слизистая оболочка респираторного тракта. Эффективность вакцинации определяется свойствами вакцинного препарата, способом их введения и природой использованных адъювантов [11, 18, 22]. Подобно тому как респираторные инфекции

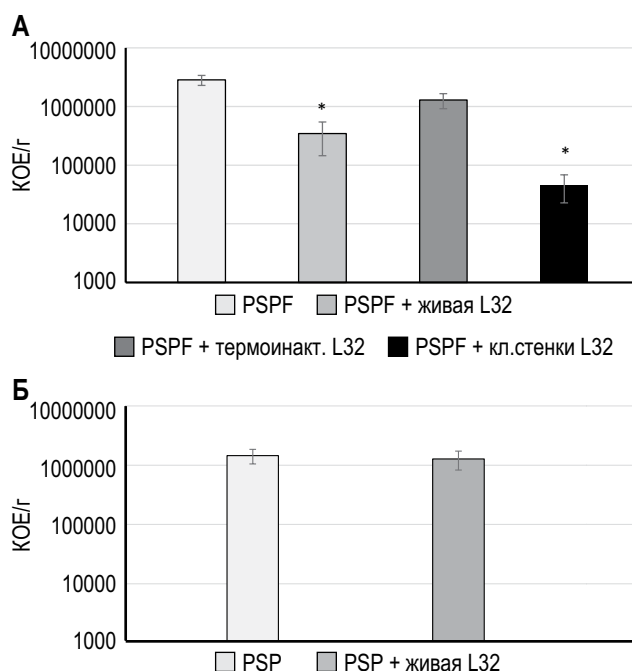


Рисунок 5. Содержание *S. pneumoniae* в селезенках мышей, иммунизированных белками PSPF (А) и PSP (Б) совместно с *L. rhamnosus* L32, через 24 часа после инфекции

Примечание. * – отличия от контрольной группы достоверны, $p < 0,05$.

стимулируют развитие местного и системного иммунного ответа, введение вакцин непосредственно через слизистые оболочки также приводит к развитию иммунных реакций на слизистых и в крови [4, 13, 14, 16]. Парентеральный путь иммунизации обеспечивает формирование системного иммунитета, но не всегда способствует индукции достаточной иммунной реакции на слизистых оболочках [5, 7, 14].

Исследование адъювантных свойств пробиотиков проводили в динамике развития иммунного ответа на вакцинные препараты, введенные интраназально. Известно, что вакцинные препараты, введенные интраназально, обычно требуют использования безопасного и эффективного адъюванта для повышения иммуногенности. В разрешенных к применению бактериальных вакцинах «Dukoral» и «Vivotif» адъювантами являются сами инаktivированные или аттенуированные бактерии *Vibrio Cholerae* и *Salminella Thyphi* [17], в некоторых вакцинах, находящихся на стадии клинических исследований в качестве адъювантов используются искусственно ослабленные бактериальные токсины [9]. Некоторые полезные для человека пробиотические лактобациллы также способны повышать устойчивость организма к инфекции, оказывая влияние на механизмы врожденного иммунитета [3, 5].

В настоящем исследовании в качестве вакцинных адъювантов были апробированы пробиотические штаммы *L. rhamnosus* CRL 1505 и L32. Их адъювантные свойства были сопоставлены при мукозальной вакцинации лабораторных животных рекомбинантными химерными белками PSPF и PSP.

Штамм *L. rhamnosus* CRL1505, выделенный в Аргентине, был ранее всесторонне исследован, доказаны его иммуномодулирующие свойства как в качестве препарата живых бактерий, так и в случае его термоинактивации [23]. Отечественный штамм *L. rhamnosus* L32 был выделен из микробиоты человека, полностью генетически охарактеризован, его иммуномодулирующие свойства исследованы на культуре ткани и в организме лабораторных животных [1].

Клеточные стенки *L. rhamnosus* CRL1505 достоверно повышали концентрацию IgA, IgM и IgG в сыворотке крови и в бронхоальвеолярных смывах мышей. После предварительной инактивации прогреванием данный пробиотический штамм не оказывал влияния на уровень иммунного ответа на белок PSPF. В то же время клеточные стенки, выделенные после ультразвуковой дезинтеграции бактерий, стимулировали продукцию специфических антител.

Протективная эффективность иммунного ответа в условиях интраназальной пневмококковой инфекции у иммунных мышей коррелировала с данными иммунологического анализа. Уровень защиты был выше в группе, получавшей вакцину с препаратом клеточных стенок пробиотика. Существенно, что адъювантный эффект препарата проявлялся по отношению к штаммам пневмококков четырех различных серотипов, что подтверждает универсальный характер вакцины по отношению к пневмококкам с различными полисахаридными антигенами. Последнее связано с широкой специфичностью химерного рекомбинантного белка PSPF благодаря включению в его состав фрагментов поверхностных бактериальных белков с консервативной структурой, общей для большинства серотипов *S. pneumoniae* [21].

Иммуномодулирующее влияние *L. rhamnosus* L32 зависело от формы введения пробиотического штамма. Наибольшей иммуностимулирующей активностью обладали живые бактерии.

Интактная форма лактобацилл усиливала секреторный ответ на PSPF. В носовых секретах после второй вакцинации происходило ускоренное накопление IgA антител. Пробиотик также

повышал уровень специфических IgG в сыворотках крови мышей.

Клеточные стенки бактерий стимулировали специфический иммунный ответ в меньшей степени по сравнению с живой культурой. Термоинактивация полностью устраняла стимулирующий эффект аналогично *L. rhamnosus* CRL1505.

В отличие от PSPF иммунный ответ на рекомбинантный белок PSP практически не изменялся под влиянием совместно введенного *L. rhamnosus* L32, независимо от его формы. Обнаруженный феномен, возможно, объясняется тем, что в структуру PSPF входит С- и N-концевые фрагменты флагеллина, а белок PSP их не содержит. Флагеллин, структурный компонент грамотрицательных бактерий, обладает иммуностимулирующим эффектом благодаря высокому родству к Toll-like рецепторам 5 типа, активирующим механизмы врожденной защиты. Связываясь с TLR5 на поверхности CD11c⁺ антигенпредставляющих клеток, флагеллиновый фрагмент химерного рекомбинантного белка способен обеспечить преимущество такой молекулы в стимуляции CD4⁺T-зависимого гуморального иммунного ответа [15].

Ранее нами было показано, что в одинаковых условиях иммунизации рекомбинантный белок PSPF обеспечивал более высокий уровень выработки специфических IgG, чем PSP [21]. Таким образом, адъювантный эффект лактобацилл проявлялся только в отношении белка PSPF, обладавшего собственным внутренним адъювантом.

Контроль за инфекцией у мышей, иммунизированных различными вариантами вакцин, позволяет заключить, что ускорение процесса очищения тканей инфицированных животных отмечено там, где наблюдается повышенный уровень иммунного ответа. Таким образом, адъ-

ювантный эффект пробиотических штаммов, вводимых одновременно с рекомбинантными химерными белками, повышает иммуногенность вакцины и способствует усилению устойчивости экспериментальных животных к пневмококковой инфекции.

Проведенные исследования показали, что два различных штамма *L. rhamnosus* были способны оказывать адъювантный эффект, проявлявшийся в усилении иммунного ответа на совместно введенный рекомбинантный химерный белок PSPF. Оба исследованных штамма теряли данное свойство после термоинактивации. Штамм *L. rhamnosus* L 32 был активен в интактном состоянии, клеточные стенки пробиотика также обеспечивали умеренный адъювантный эффект. Штамм *L. rhamnosus* CRL1505 в данной работе в форме живых бактерий не был исследован, однако его клеточные стенки обладали выраженным адъювантным эффектом. Все вышесказанное свидетельствует о том, что пробиотические лактобациллы могут быть использованы в составе мукозальных вакцин в качестве адъювантов, однако эта способность зависит от свойств вакцинного препарата и формы введения пробиотика.

С одной стороны, возможность избежать использования живых бактериальных культур повышает безопасность и стабильность адъюванта. С другой стороны, исключая использование живых бактерий при иммунизации, можно потерять собственно пробиотический эффект живых культур, а именно повышение общей устойчивости организма [12]. Последнее в сочетании с усилением адаптивного иммунитета способно обеспечить усиленную защиту на пути развития пневмококковых инфекций.

Список литературы / References

1. Аверина О.В., Ермоленко Е.И., Ратушный А.Ю., Тарасова Е.А., Борщев Ю.Ю., Леонтьева Г.Ф., Крамская Т.А., Котылева М.П., Даниленко В.Н., Суворов А.Н. Влияние пробиотиков на продукцию цитокинов в системах *in vitro* и *in vivo* // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 443-454. [Averina O.V., Ermolenko E.I., Ratushnyi A.Yu., Tarasova E.A., Borshev Yu.Yu., Leontieva G.F., Kramskaya T.A., Kotyleva M.P., Danilenko V.N., Suvorov A.N. Influence of probiotics on cytokine production in the *in vitro* and *in vivo* systems. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 443-454. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-443-454>
2. Европейское региональное бюро ВОЗ // Еженедельный эпидемиологический бюллетень, 87-й год. № 14, 2012. Т. 87. С.129-144. [European Region WHO Bureau. *Ezhenedel'nyy epidemiologicheskyy byulleten' = Weekly Epidemiological Record (WER)*, 87 year, 2012, Vol. 87, no. 14, pp. 129-144. (In Russ.)]
3. Крамская Т.А., Леонтьева Г.Ф., Грабовская К.Б., Королева И.В., Гупалова Т.В., Кулешевич Е.В., Суворов А.Н. Исследование защитных механизмов действия препарата поливалентной рекомбинантной вакцины на основе консервативных белков для профилактики инфекций, вызываемых стрептококками группы В // Медицинский алфавит, 2014. № 3. С. 95-98 (Больница). [Kramskaya T.A., Leontieva G.F., Grabovskaya K.B., Koroleva I.V., Gupalova T.V., Kuleshevitch E.V., Suvorov A.N. Evaluation of defense mechanisms of polyvalent recombinant vaccine based on conservative proteins for Streptococcus Group B diseases protection. *Meditsinskiy alfavit = Medical Alfabeth*, 2014, no. 3, pp. 95-98 (Hospital). (In Russ.)]
4. Baron S.D., Singh R., Metzger D.W. Inactivated Francisella tularensis live vaccine strain protects against respiratory tularemia by intranasal vaccination in an immunoglobulin A-dependent fashion. *Infect. Immun.*, 2007, Vol. 75, pp. 2152-2162.
5. Belyakov I.M., Derby M.A., Ahlers J.D., Kelsall B.L., Earl P., Moss B., Strober W., Berzofsky J.A. Mucosal immunization with HIV-1 peptide vaccine induces mucosal and systemic cytotoxic T lymphocytes and protective immunity in mice against intrarectal recombinant HIV-vaccine challenge *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, Vol. 95, pp. 1709-1714.

6. Bergmann-Leitner E.S., Leitner W.W. Adjuvants in the driver's seat: How magnitude, type, fine specificity and longevity of immune responses are driven by distinct classes of immune potentiators. *Vaccines (Basel)*, 2014, no. 2, pp. 252-296.
7. Gallichan W.S., Rosenthal K.L. Long-lived cytotoxic T lymphocyte memory in mucosal tissues after mucosal but not systemic immunization. *J. Exp. Med.*, 1996, Vol. 184, pp. 1879-1890.
8. Holmgren J., Czerkinsky C. Mucosal immunity and vaccines. *Nat. Med.*, 2005, no. 4, pp. 45-53.
9. Savelkoul H.F., Ferro V.A., Strioga M.M., Schijns V.E. Choice and design of adjuvants for parenteral and mucosal vaccines. *Vaccines (Basel)*, 2015, Vol. 3, no. 1, pp. 148-171.
10. Jain, S., Yadav, H., Sinhá, P.R. Stimulation of innate immunity by oral administration of dahi containing probiotic *Lactobacillus casei* in mice. *J. Méd. Food*, 2008, Vol. 11, pp. 652-656.
11. Kinnear C.L., Strugnell R.A. Vaccination method affects immune response and bacterial growth but not protection in the *Salmonella* Typhimurium animal model of typhoid. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 10, p. e0141356.
12. Kitazawa H., Alvarez S., Suvorov A., Melnikov V., Villena J., Sánchez B. Recent advances and future perspective in microbiota and probiotics. *Biomed. Res. Int.*, 2015, Vol. 2015, Art. 275631.
13. Li F.V., Moon J.J., Abraham W., Suh H., Elkhader J., Seidman M.A., Yen M., Im E.-J., Foley M.H., Barouch D.H., Irvine D.J. Generation of effector memory T cell-based mucosal and systemic immunity with pulmonary nanoparticle vaccination. *Sci. Transl. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 204.
14. Lycke N. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 592-605.
15. Mizel S.B., Bates J.T. Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 10, pp. 5677-5682.
16. Mora J.R., Bono M.R., Manjunath N., Weninger W., Cavanagh L.L., Roseblatt M., Von Andrian U.H. Selective imprinting of gut-homing T cells by Peyer's patch dendritic cells. *Nature*, 2003, Vol. 424, pp. 88-93.
17. Nizard M., Diniz M.O., Rousse H., Tran T., Ferreira L.C.S., Badoua C., Tartour E. Mucosal vaccines Novel strategies and applications for the control of pathogens and tumors at mucosal sites Mucosal immunity and vaccines. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, 2014, Vol. 10, no. 8, pp. 2175-2187.
18. Peng S., Qiu J., Yang A., Yang B., Jeang J., Wang J.-W., Chang Y.-N., Brayton C., Roden B.S., Hung C., Wu T.-C. Optimization of heterologous DNA-prime, protein boost regimens and site of vaccination to enhance therapeutic immunity against human papilloma virus-associated disease. *Cell Biosci.*, 2016, Vol. 6, p. 16.
19. Salva S., Villena J., Alvarez S. Immunomodulatory activity of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from goat milk: impact on intestinal and respiratory infections. *International Journal of Food Microbiology*, 2010, Vol. 141, pp. 82-89.
20. Suvorov A., Ustinovich I., Meringova L., Grabovskaya K., Leontieva G., Vorobieva E., Totolian A.. Construction of recombinant polypeptides based on beta antigen C (Bac) protein and their usage for protection against group B streptococcal infection. *Indian J. Med. Res.*, 2004, pp. 228-232.
21. Suvorov A., Dukhovlinov I., Leontieva G., Kramskaya T., Koroleva I., Grabovskaya K., Fedorova E., Chernyaeva E., Klimov N., Orlov A., Uversky V. Chimeric protein PSPF, a potential vaccine for prevention *Streptococcus*. *Vaccines and Vaccination*, 2015, Vol. 6, Iss. 6.
22. Trivedi S., Ranasinghe C. The influence of immunization route, tissue microenvironment, and cytokine cell milieu on HIV-specific CD8⁺ T cells measured using fluidigm dynamic arrays. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 5, p. e012648.
23. Villena J., Salva S., Núñez M., Corzo J., Tolaba R., Faedda J., Font de Valdez G., Alvarez S. Probiotics for everyone! The novel immunobiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL1505 and the beginning of social probiotic programs in Argentina. *IJBWI*, 2012, pp. 189-198.
24. Vorobieva E., Meringova L., Leontieva G., Grabovskaya K., Suvorov A. Analysis of recombinant group B streptococcal protein ScaAB and evaluation of its immunogenicity. *Folia Microbiol.*, 2005, pp. 172-176.
25. WHO initiative for Vaccine Research. <http://www.who.int/immunization/research/en>

Авторы:

Леонтьева Г.Ф. — к.б.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Крамская Т.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Габовская К.Б. — к.м.н., старший научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Филимонова В.Ю. — научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
Лайно Джонатан — научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина
Виллена Джулио — профессор, руководитель лаборатории иммунобиотехнологии, Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина
Альварес Сусанна — научный сотрудник лаборатории иммунобиотехнологии, Референсный центр по исследованию лактобацилл, Тукуман, Аргентина
Даниленко В.Н. — д.б.н., профессор, заведующий отделом генетических основ биотехнологии ФГБУН «Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова» РАН, Москва, Россия
Суворов А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; заведующий кафедрой фундаментальных проблем медицины и медицинской технологии, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Поступила 27.07.2016

Отправлена на доработку 29.08.2016

Принята к печати 01.09.2016

Authors:

Leontieva G.F., PhD (Biology), Leading Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Kramskaya T.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Grabovskaya K.B., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Filimonova V.Yu., Research Associate, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Jonathan Laino, Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

Julio Villena, Professor, Head, Laboratory of Immunobiotechnology, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

Susanna Alvares, Research Associate, Laboratory of Immunobiotechnology, Reference Centre for Lactobacilli (CERELA-CONICET), Tucuman, Argentina

Danilenko V.N., PhD, MD (Biology), Head, Division of Fundamental Genetic Studies in Biotechnology, Institute of General Genetics, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Head, Division of Molecular Microbiology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Received 27.07.2016

Revision received 29.08.2016

Accepted 01.09.2016

РОЛЬ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* M49-16 В ИНГИБИЦИИ ПРОЛИФЕРАЦИИ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА ЛИНИИ EA.hy926

**Старикова Э.А.¹, Карасева А.Б.¹, Бурова Л.А.¹, Суворов А.Н.¹,
Соколов А.В.¹, Васильев В.Б.¹, Фрейдлин И.С.^{1, 2}**

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

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

Резюме. Аргининдеиминаза (АД) — бактериальный фермент, который осуществляет гидролиз аргинина с образованием цитруллина и аммиака. В последние годы в литературе накапливается все больше данных об антиангиогенном действии АД *Mycoplasma spp.* в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Наши исследования показали, что АД *Streptococcus pyogenes* тип M22 обладает аналогичным эффектом, а именно — подавляет пролиферацию и другие функции эндотелиальных клеток, связанные с процессом ангиогенеза. Для подтверждения ведущей роли АД как фактора, ответственного за антипролиферативное действие, был сконструирован изогенный мутант *S. pyogenes* тип M49-16, не способный экспрессировать АД. Был проведен сравнительный анализ антипролиферативной активности *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД (M49-16delAD) в отношении эндотелиальных клеток линии EA.hy926. В работе использовали супернатанты разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* M49-16 и M49-16delAD. В ходе исследований проводили сравнение способности супернатантов разрушенных *S. pyogenes* M49-16 и M49-16delAD гидролизовать аргинин. Кроме того, изучали влияние супернатантов разрушенных стрептококков на пролиферативную активность эндотелиальных клеток и их распределение по фазам клеточного цикла. Исследования показали, что супернатант исходного штамма *S. pyogenes* 49-16 достоверно подавлял пролиферацию эндотелиальных клеток (на 50% от контроля). Этот эффект был обусловлен его аргинингидролизующей активностью, т.к. добавление в среду экзогенного аргинина приводило к восстановлению пролиферации клеток до уровня пролиферации в контроле. Супернатант *S. pyogenes* M49-16delAD обладал достоверно сниженной по сравнению с супернатантом исходного штамма способностью гидролизовать аргинин. Культивирование эндотелиальных клеток в присутствии супернатанта *S. pyogenes* M49-16delAD приводило к снижению их пролиферативной активности только на 10% от контроля. Анализ распределения клеток по фазам клеточного цикла подтвердил эти результаты. Супернатант *S. pyogenes* M49-16 снижал долю клеток в фазах синтеза на 20% по сравнению с контролем. В присутствии супернатанта *S. pyogenes* M49-16delAD уменьшение доли клеток в фазах синтеза было выражено достоверно слабее и составило всего 5% от контроля. Полученные результаты раскрывают новые патогенетические механизмы эндотелиальной дисфункции при стрептококковой инфекции и доказывают антиангиогенный потенциал стрептококковой аргининдеиминазы.

Ключевые слова: *S. pyogenes*, аргининдеиминаза, эндотелиальные клетки, аргинин, пролиферация

Адрес для переписки:

Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-16-69.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:

Starikova Eleonora A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-16-69.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.А. Старикова, А.Б. Карасева, Л.А. Бурова,
А.Н. Суворов, А.В. Соколов, В.Б. Васильев, И.С. Фрейдлин
«Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes*
M49-16 в ингибции пролиферации эндотелиальных клеток
человека линии EA.hy926» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 6. С. 555–562.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562

© Старикова Э.А. и соавт., 2016

For citation:

E.A. Starikova, A.B. Karaseva, L.A. Burova, A.N. Suvorov,
A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev, I.S. Freidlin “A role of arginine
deiminase from *Streptococcus pyogenes* M49-16 in promoting
infection and inhibition of endothelial cell proliferation”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2016,
Vol. 18, no. 6, pp. 555–562.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-555-562>

A ROLE OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* M49-16 IN PROMOTING INFECTION AND INHIBITION OF ENDOTHELIAL CELL PROLIFERATION

Starikova E.A.^a, Karaseva A.B.^a, Burova L.A.^a, Suvorov A.N.^a, Sokolov A.V.^a, Vasilyev V.B.^a, Freidlin I.S.^{a, b}

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

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

Abstract. Arginine deiminase is a bacterial enzyme that hydrolyses arginine with citrulline and ammonia formation. In recent years, increasing evidence is reported about *in vitro* and *in vivo* anti-angiogenic action of arginine deiminase from *Mycoplasma spp.* Our studies have shown that arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22 exerts similar effects, i.e., inhibits proliferation and other endothelial cell functions related to angiogenesis. To confirm a leading role of arginine deiminase, as a factor responsible for the anti-proliferative effect, we have constructed an isogenic *S. pyogenes* M49-16 mutant unable to express arginine deiminase. A comparative analysis of anti-proliferative activity of original *S. pyogenes* M49-16 strain and its isogenic mutant with arginine deiminase gene deletion (M49-16delAD) was performed, using an endothelial EA.hy926 cell line. The bacterial supernatantes obtained by sonication of *S. pyogenes* M49-16 and M49-16delAD were tested. The ability of *S. pyogenes* M49-16 and M49-16delAD supernatantes to hydrolyze arginine was assessed. Moreover, we compared effects of the *Streptococcus* supernatantes upon proliferative activity of endothelial cells and their distribution through the cell cycle phases.

Supernatantes from original *S. pyogenes* 49-16 strain were shown to inhibit endothelial cell proliferation to a significant degree (down to 50% of controls). This effect was due to its arginine hydrolyzing activity, i. e. addition of exogenous arginine to the medium resulted into recovery of the cell proliferation levels. The supernatante from *S. pyogenes* M49-16delAD showed a lower ability to hydrolyze arginine as compared to the supernatante of original strain. Culturing of endothelial cells supplied with *S. pyogenes* M49-16delAD supernatantes resulted into reduction of their proliferative activity by 10% of control values. Analysis of the cell cycle distribution was concordant with these results. *S. pyogenes* M49-16 supernatante caused a decrease in S-phase cell fraction by 20% against controls. With a supernatants from *S. pyogenes* M49-16delAD, such drop in DNA-synthesizing cell ratio was significantly weaker (by only 5% of the control). These results reveal new pathogenetic mechanisms of endothelial dysfunction during streptococcal infection and suggest anti-angiogenic potential of streptococcal arginine deiminase.

Keywords: *S. pyogenes*, arginine deiminase, endothelial cells, arginine, proliferation

Работа поддержана грантом РФФИ № 16-04-00150.

Введение

Многие патогенные микроорганизмы используют метаболические пути аргинина организма-хозяина в качестве стратегии выживания [8]. Одним из бактериальных ферментов, катализирующих гидролиз аргинина, является аргининдеиминаза (АД) [23]. АД защищает микроорганизмы от кислой среды в очаге инфекции и в фаголизосомах благодаря продукции NH_3 [6]. Очевидно, что фермент может нарушать функциональную активность клеток организма-хозяина за счет деплеции аргинина и его метаболитов. Многочисленные исследования показывают, что АД, выделенная из разных микроорганизмов, подавляет пролиферацию клеток млекопитающих *in vitro*. В частности, установлено, что АД подавляет пролиферацию трансформированных

клеток и оказывает противоопухолевое действие *in vivo* с минимальными побочными эффектами [12, 15]. Предполагают, что подавление роста опухолевых клеток происходит благодаря аминокислотному голоданию из-за деплеции аргинина и/или созданию дефицита метаболитов этой аминокислоты, таких как NO и полиамины [14, 16]. Однако противоопухолевое действие фермента может быть обусловлено также его антиангиогенной активностью. Было показано, что АД *Mycoplasma sp.* (нативный и рекомбинантный белок) снижает пролиферативную, миграционную способность эндотелиальных клеток, а также формирование капилляроподобных структур *in vitro* и *in vivo* [3, 16]. В литературе обсуждаются возможные механизмы антиангиогенного действия АД, среди которых выделяют аминокислотное голодание. Не исключается также роль дефицита метаболитов аргинина (NO и полиаминов), который возникает вследствие деплеции этой аминокислоты [16]. Вопрос о влиянии АД

на продукцию NO остается дискуссионным. Существуют данные указывающие на важную роль NO в регуляции пролиферации эндотелиальных клеток. В то же время показано, что дефицит аргинина, в том числе вызванный активностью АД, не влияет на способность эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) генерировать NO [7]. Доказано, что дефицит полиаминов, которые играют важную роль в процессах трансляции, транскрипции и пролиферации всех эукариотических клеток, может приводить к подавлению их пролиферативной активности. Не исключено, что обнаруженное антиангиогенное действие фермента может быть связано с токсичностью аммиака, который генерирует АД [16]. Таким образом, точные механизмы, лежащие в основе антиангиогенного действия АД, остаются невыясненными и требуют дальнейшего изучения.

В наших исследованиях по изучению влияния внутриклеточных компонентов *Streptococcus pyogenes* тип M22, штамм AL168 на функции эндотелиальных клеток было обнаружено, что супернатант разрушенных ультразвуком стрептококков (CPC) подавлял пролиферацию, миграцию, адгезию и метаболизм этих клеток [2]. Пролиферативная активность клеток восстанавливалась при добавлении в культуру экзогенного аргинина, что свидетельствовало об аргинин-деградирующей активности CPC. Биохимическая характеристика компонента в составе CPC, ответственного за обнаруженные эффекты, показала, что активным веществом является АД [18]. Чтобы подтвердить полученные ранее данные о роли АД *S. pyogenes* в подавлении пролиферации эндотелиальных клеток, в ходе данной работы был сконструирован изогенный мутант штамма — *S. pyogenes* M49-16, неспособный экспрессировать АД, и был проведен сравнительный анализ антипролиферативной активности исходного штамма CPC *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД (M49-16delAD).

Материалы и методы

Культура клеток

Эндотелиальные клетки линии EA.hy 926 были любезно предоставлены д-ром Cora-Jean S. Edgell (Университет Северная Каролина, США). Линия воспроизводит основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток макрососудов человека [11]. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки эмбрионов коров, НАТ (все — Sigma), 4 mM L-глутамин, 100 мкг/мл гентамицина (Биолот). Пересев производили дважды в неделю. Дезинтеграцию монослоя клеток вызывали инкубацией в растворе Версена (Биолот).

Получение изогенного мутанта по гену аргининдеиминазы

Для создания штамма, неспособного синтезировать АД, участок гена, кодирующий центральную часть гена аргининдеиминазы штамма серотипа M49, был проклонирован в интегративную плазмиду pT7ermB. Для этих целей участок sagp49 амплифицировали с использованием ДНК праймеров 3' GGAGGATCCGTTGTTTGATGA 5' и 3' CGAGTGAATCCATTACGGTCA 5' со встроенными сайтами гидролиза BamHI и EcoRI. Продукт амплификации клонировали в интегративный вектор pT7ermB, предварительно также гидролизованный эндонуклеазами BamHI и EcoRI. Полученным после лигирования препаратом трансформировали штамм *E. coli* JM109 и клоны с плазмидой отбирали при выращивании на чашках Петри с эритромицином 500 мкг/мл. Рекомбинантные клоны *E. coli* тестировали на наличие плазмиды pT7ermB — АД с фрагментом гена АД размером 538 н.п. Из клонов с нужной вставкой выделяли плазмидную ДНК, которую и использовали для трансформации стрептококков.

Электропорацию стрептококков осуществляли в аппарате компании BioRad — Gene-Pulser (USA) в кюветах с расстоянием между электродами 1 мм. Электропорацию осуществляли на культуре стрептококков, четырехкратно отмытой 10% глицеролом, в поздней логарифмической фазе роста. После электропорации стрептококки с интегративной плазмидой pT7ermB — АД, неспособной реплицироваться автономно в стрептококках и предназначенной для интеграции в область гена АД, инкубировались 2 часа при 37 °C, а затем высевались на агар с 2,5 мкг/мл эритромицина. Клоны стрептококков, устойчивые к антибиотику, проверялись на наличие искомой конструкции в геноме с использованием ПЦР и последующего секвенирования.

Получение супернатантов разрушенных ультразвуком *S. pyogenes*

CPC, содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты, были приготовлены из культур бактериальных клеток *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена АД M49-16delAD. Стрептококки выращивали в течение 18-20 часов при 37 °C в среде Todd-Hewitt (Difco) в аэробных условиях, осаждали центрифугированием и производили двукратную отмывку PBS (150 mM NaCl, 10 mM Na-фосфатный буфер, pH 7,4), не содержащим липополисахарида. Концентрацию суспензии бактериальных клеток стандартизировали по оптической плотности и доводили до $2,5-5 \times 10^8$ КОЕ/мл. Ультразвуковая дезинтеграция стрептококков проводилась в объеме 5 мл взвеси бактерии в PBS при pH 7,4

в течение 5 мин, при частоте 22 kHz и мощности 0,6–0,8 мА дезинтегратора (MSE). Полноту разрушения бактериальных клеток контролировали микроскопически, после чего суспензию центрифугировали при 1600 g 30 мин. Полученный супернатант подвергали стерилизации с использованием фильтров Filtropure S с размером пор 0,45 мкм (Sarstedt) и хранили при -20 °C. Используемые концентрации бактериальных компонентов не оказывали токсического действия на культуры клеток.

Определение ферментативной активности АД в супернатантах разрушенных *S. pyogenes*

Метод определения активности АД основан на измерении уменьшения концентрации аргинина в среде, который определяют по окрашенному в желтый цвет продукту реакции аргинина с тимолом и гипобромитом натрия в щелочной среде. Образующийся в АД-реакции аммоний помимо ослабления желтой окраски, характерной для аргинина, давал индофенольную реакцию — голубое окрашивание [18]. Для анализа к 100 мкл раствора 5 мМ аргинин гидрохлорида в 50 мМ Na-фосфатном буфере (pH 6,8) добавляли испытуемую на активность пробу — 2,5, 5 и 10 мкл, инкубировали в течение 30 минут при 37 °C и останавливали реакцию добавлением 50 мкл 100 мМ тимолом и 100 мкл 40 мМ гипобромита натрия, растворенных в 2 М NaOH. Реакцию проводили в 96-луночных микропланшетах и регистрировали оптическую плотность на планшетном спектрофотометре при 450 нм. Для каждого эксперимента строили калибровочный график зависимости поглощения при 450 нм от концентрации аргинина (диапазон 0,25–5 мМ). Активность выражали в мкмоль аргинина, утилизированного ферментом за 1 минуту, с учетом доли вносимой в реакцию пробы от общего объема.

Анализ пролиферативной активности эндотелиальных клеток

Для оценки пролиферативной активности клетки вносили в 96-луночные плоскодонные планшеты (Sarstedt) в концентрации 5 тыс. в 100 мкл полной культуральной среды и инкубировали 72 ч в присутствии исследуемых веществ при 37 °C во влажной атмосфере с 5% CO₂. По окончании инкубации клетки окрашивали 0,2% раствором кристаллического фиолетового (Sigma-Aldrich) на 10% метаноле. Избыток красителя удаляли пятикратной отмывкой деионизированной водой. Краситель экстрагировали 10% уксусной кислотой и измеряли оптическую плотность на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad Laboratories) при длине волны 570 нм.

Анализ распределения эндотелиальных клеток по фазам клеточного цикла

Клетки вносили в лунки плоскодонного 6-ти луночного планшета (Sarstedt) в концентрации 500–600 тыс. клеток на 1 мл культуральной среды и инкубировали в присутствии исследуемых веществ. Через 24 часа клетки переносили в микропробирки и производили фиксацию/пермеабиллизацию 95% ледяным метанолом в течение 5 минут. После чего проводили окрашивание клеточной суспензии антителами против циклина A2, конъюгированными с FITC (Beckman Coulter). В каждую пробирку вносили 2 мкг/мл пропидия иодида (Sigma-Aldrich), 100 мкг/мл рибонуклеазы A (Sigma-Aldrich) и проводили инкубацию 20 мин при комнатной температуре в темноте. Образцы анализировали с использованием проточного цитофлуориметра Navios (Beckman Coulter).

Статистическую обработку данных производили с использованием t-критерия Стьюдента, программы STATISTICA 6.0.

Результаты

Сравнение активности АД в составе CPC M49-16 и изогенного мутанта M49-16delAD показало, что способность гидролизовать аргинин у CPC M49-16delAD ($0,4 \pm 0,1$ мкмоль аргинина за минуту) составляет лишь 4% от активности CPC M49-16 ($10,2 \pm 0,2$ мкмоль аргинина за минуту).

Эксперименты по изучению пролиферативной активности CPC показали, что во всех исследуемых разведениях (1/100, 1/50 и 1/25) CPC M49-16 вызывал достоверное двукратное уменьшение пролиферации эндотелиальных клеток (табл. 1). Пролиферация клеток в присутствии CPC M49-16delAD в разведении 1/100 не отличалась от пролиферации клеток в контроле, тогда как в разведениях 1/50 и 1/25 снижение пролиферативной активности эндотелиальных клеток было достоверным, но не превышало 10% от контроля. Антипролиферативное действие CPC M49-16 было достоверно сильнее, чем антипролиферативное действие CPC M49-16delAD.

Внесение в культуральную среду экзогенного аргинина в концентрации 2 мМ не оказывало влияния на пролиферацию клеток, а в концентрации 4 мМ приводило к достоверному снижению пролиферации на 20% (табл. 2). Это подтверждает данные других исследователей о том, что сам аргинин в высоких концентрациях может оказывать антипролиферативное действие на клетки [9]. При добавлении 4 мМ аргинина пролиферация эндотелиальных клеток, подавленная под влиянием CPC M49-16 до 50% от контроля, повы-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ВЛИЯНИЯ СРС *S. PYOGENES* M49-16 И M49-16delAD НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЛИНИИ EA.hy926

Инкубация клеток в присутствии	Интенсивность пролиферации, % ($M \pm m$, n = 18) при разведении СРС			
	0	1/100	1/50	1/25
M49-16	100,0	52,1 $\pm$ 3,26***	47,8 $\pm$ 1,88***	48,4 $\pm$ 0,58***
M49-16delAD	100,0	100,3 $\pm$ 2,50###	91,4 $\pm$ 2,00** ###	88,7 $\pm$ 3,21** ###

Примечание. * – пролиферация клеток достоверно ниже в присутствии СРС по сравнению с пролиферацией клеток в контроле (*** – при $p < 0,001$; ** – при $p < 0,01$);

– пролиферация клеток в присутствии СРС M49-16 достоверно ниже по сравнению с пролиферацией клеток в присутствии СРС M49-16delAD (### – при $p < 0,001$).

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОГЕННОГО АРГИНИНА НА ПРОЛИФЕРАЦИЮ ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК EA.hy926 В ПРИСУТСТВИИ СРС *S. PYOGENES* M49-16 И M49-16delAD

Инкубация клеток в присутствии	Интенсивность пролиферации, % ($M \pm m$, n = 18)		
	без аргинина	2 мМ аргинина	4 мМ аргинина
культуральной среды	100,0 $\pm$ 1,12	95,9 $\pm$ 2,17	77,4 $\pm$ 5,93###
СРС M49-16 1/50	50,8 $\pm$ 3,90***	68,8 $\pm$ 3,16##	75,3 $\pm$ 2,04###
СРС M49-16delAD 1/50	86,0 $\pm$ 1,66***	90,4 $\pm$ 0,97#	83,9 $\pm$ 1,13

Примечание. * – пролиферация клеток в присутствии СРС достоверно ниже по сравнению с пролиферацией клеток без СРС в тех же условиях (*** – при $p < 0,001$);

– пролиферация клеток достоверно выше в присутствии аргинина по сравнению с пролиферацией клеток в тех же условиях, но без аргинина (### – при $p < 0,001$; ## – при $p < 0,01$; # – при $p < 0,05$).

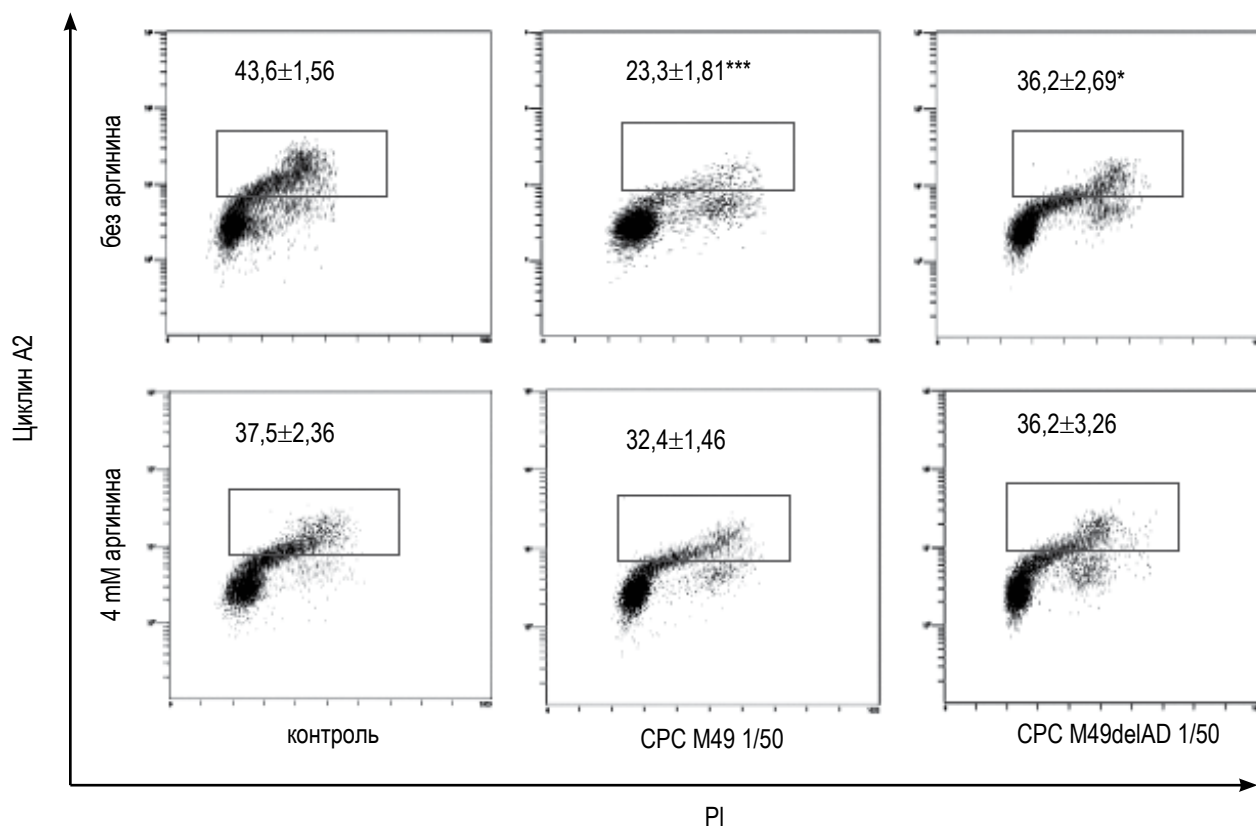


Рисунок 1. Влияние экзогенного аргинина на распределение эндотелиальных клеток EA.hy926 по фазам клеточного цикла в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16 и M49-16delAD

Примечание. * – пролиферация клеток достоверно ниже в присутствии СРС по сравнению с пролиферацией клеток в контроле (*** – при $p < 0,001$; * – при $p < 0,05$).

шалась до 70%, а в концентрации 4 мМ аргинин повышал пролиферативную активность клеток до ее уровня в контроле. Внесение в культуральную среду, содержащую M49-16delAD, экзогенного аргинина также приводило к повышению пролиферации эндотелиальных клеток. Однако достоверным эффект был только при концентрации аргинина 2мМ.

Данные о влиянии СРС M49-16 и СРС M49-16delAD на пролиферативную активность эндотелиальных клеток, полученные с помощью спектрофотометрического метода, были подтверждены результатами анализа распределения клеток по фазам клеточного цикла. Культивирование в присутствии СРС M49-16 приводило к достоверному (на 20% по сравнению с контролем) снижению доли клеток в фазах синтеза G₂/S. СРС M49-16delAD также достоверно снижал долю клеток в фазах синтеза (на 5% по сравнению с контролем), однако эффект был достоверно слабее, чем антипролиферативное действие СРС M49-16 (рис. 1). При внесении в культуральную среду экзогенного аргинина доля клеток в фазах синтеза G₂/S возрастала до уровня контроля.

Обсуждение

Большинство исследований АД *S. pyogenes* посвящено изучению антипролиферативного действия фермента в отношении опухолевых клеток. В 1985 г. Yoshida J. и соавторами был выделен и охарактеризован streptococcal acidic glycoprotein (SAGP) в составе экстракта клеток *Streptococcus hemolyticus* Su, подавляющий пролиферацию разных типов эукариотических клеток [20]. Позднее было показано, что SAGP обладает аргинингидролизующей активностью и имеет высокую степень гомологии с аргининдеиминазами, выделенными из других бактерий [9]. Была доказана способность фермента, подавлять пролиферацию мононуклеарных лейкоцитов периферической крови, клеток глиобластомы, клеток карциномы кожи A431 и др. [9, 13, 21]. В то же время действие АД из *S. pyogenes* в отношении эндотелиальных клеток остается недостаточно изученным.

Известно, что при стрептококковой инфекции в участке воспаления возникают поражения сосудов. Это выражается в нарушении процесса коагуляции, снижении адгезивности эндотелиальных клеток и повышении проницаемости эндотелиального барьера [1]. Описанные эффекты связывают с индукцией экспрессии на эндотелиальных клетках тканевого фактора и активацией матриксных металлопротеаз [4, 5, 19]. Эндотелиальные клетки экспрессируют eNOS и аргиназу — ферменты, субстратом для которых является аргинин, поэтому метаболиты аргинина играют

важную роль в регуляции функций эндотелия сосудов. NO, генерируемый eNOS, аутокринно регулирует тонус сосудов, ограничивает развитие воспаления и агрегацию тромбоцитов [7]. Цитозольная и митохондриальная аргиназы эндотелиальных клеток осуществляют синтез необходимых для пролиферации и ремоделирования сосудов полиаминов и пролина [10]. Исходя из этого, можно предположить, что дефицит аргинина, вызванный активностью стрептококковой АД, может способствовать развитию эндотелиальной дисфункции.

Ранее нами была выделена и охарактеризована АД *S. pyogenes*, тип M22, штамм AL168 и показана способность фермента подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток. В ходе настоящего исследования для доказательства ведущей роли АД в подавлении пролиферативной активности этих клеток был сконструирован изогенный мутант, не способный экспрессировать АД, и изучена его аргинингидролизующая и антипролиферативная активность. Проведенные исследования показали, что суператант разрушенных *S. pyogenes* M49-16 исходного штамма обладал аргинингидролизующей активностью и оказывал достоверное антипролиферативное действие на эндотелиальные клетки. Этот эффект был связан с деплецией аргинина в культуральной среде, т.к. при добавлении экзогенного аргинина пролиферативная активность клеток восстанавливалась до уровня контроля. СРС M49-16delAD с делецией гена АД обладал значительно сниженной по сравнению с СРС M49-16 способностью гидролизовать аргинин и подавлять пролиферацию эндотелиальных клеток (табл. 1). Однако, если дефицит аргинина, вызванный активностью СРС, компенсировали добавлением аргинина, то пролиферация эндотелиальных клеток восстанавливалась до уровня пролиферации клеток в контроле не только в случае СРС M49-16, но также в случае СРС M49-16delAD. Это может быть связано с тем, что стрептококки экспрессируют и другие (кроме АД) метаболизирующие аргинин ферменты, низкая активность которых обнаруживается в СРС M49-16delAD.

В данной работе с использованием СРС M49-16 и СРС мутанта M49-16delAD, не способного синтезировать АД, были получены дополнительные доказательства того, что антипролиферативное действие СРС в отношении эндотелиальных клеток обусловлено аргинин-гидролизующей активностью АД. Эндотелий сосудов играет важную роль в регуляции процесса воспаления и иммунного ответа. В период острой фазы воспаления быстрый рост сосудов обеспечивает поддержание необходимого уровня метаболизма

в тканях, поступление медиаторов воспаления, а также миграцию лейкоцитов. Пролиферация эндотелиальных клеток и формирование новых сосудов сопровождается регенерацией тканей в участке альтерации. Дизрегуляция этих процессов, вызванная эндотелиальной дисфункцией, может служить дополнительным патогенетическим фактором, усугубляющим тяжесть инфек-

ционного процесса, и способствовать его переходу в хроническую форму. Результаты данного исследования раскрывают новые патогенетические механизмы эндотелиальной дисфункции при стрептококковой инфекции и позволяют предположить, что противоопухолевые эффекты АД частично связаны с антиангиогенными свойствами этого фермента.

Список литературы / References

1. Киселев П.Н. Токсикология инфекционных процессов. Л.: Медицина, 1971. 359 с. [Kiselev P.N. Infectious processes toxicology]. Leningrad: Medicine, 1971. 359 p.
2. Старикова Э.А., Лебедева А.М., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С. Изменения функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата *Streptococcus pyogenes* // Цитология, 2012. Т. 54, № 1. С. 49-57. [Starikova E.A., Lebedeva A.M., Burova L.A., Freidlin I.S. Regulation of endothelial cells functions by ultrasonic supernatant of *Streptococcus pyogenes*. *Tsitologiya = Citology*, 2012, Vol. 54, no. 1, pp. 49-57. (In Russ.)]
3. Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent. *Cancer. Lett.*, 2002, Vol. 183, no. 2, pp. 155-162.
4. Burns E., Marsiel A., Musser J. Activation of a 66-Kilodalton human endothelial cell matrix metalloprotease by *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease. *Infection and Immunity*, 1996, Vol. 64, pp. 4744-4750.
5. Bryant A.E. Biology and pathogenesis of thrombosis and procoagulant activity in invasive infections caused by group A streptococci and *Clostridium perfringens*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, Vol. 16, no. 3, pp. 451-462.
6. Casiano-Colon A., Marquis R.E. Role of the arginine deiminase system in protecting oral bacteria and an enzymatic basis for acid tolerance. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988, Vol. 54, no. 6, pp. 1318-1324.
7. Chen F., Lucas R., Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 184.
8. Das P., Lahiri A., Lahiri A., Chakravorty D. Modulation of the Arginase Pathway in the Context of Microbial Pathogenesis: A Metabolic Enzyme Moonlighting as an Immune Modulator. *PLoS Pathog.*, 2010, Vol. 6, no. 6, e1000899.
9. Degnan B.A., Palmer J.M., Robson T., Jones C.E., Fischer M., Glanville M., Mellor G.D., Diamond A.G., Kehoe M.A., Goodacre J.A. Inhibition of human peripheral blood mononuclear cell proliferation by *Streptococcus pyogenes* cell extract is associated with arginine deiminase activity. *Infect. Immun.*, 1998, Vol. 66, no. 7, pp. 3050-3058.
10. Durante W. Role of arginase in vessel wall remodeling. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 4, p. 111.
11. Edgell C.-J.S., McDonald C.C., Graham J.B. Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Nati. Acad. Sci. USA*, 1983, Vol. 80, no. 12, pp. 3734-3737.
12. Feun L.G., Kuo M.T., Savaraj N. Arginine deprivation in cancer therapy. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, 2015, Vol. 18, no. 1, pp. 78-82.
13. Fiedler T., Strauss M., Hering S., Redanz U., William D., Rosche Y., Classen C.F., Kreikemeyer B., Linnebacher M., Maletzki C. Arginine deprivation by arginine deiminase of *Streptococcus pyogenes* controls primary glioblastoma growth *in vitro* and *in vivo*. *Cancer Biol. Ther.*, 2015, Vol. 16, no. 7, pp. 1047-1055.
14. Kim R.H., Bold R.J., Kung H.J. ADI, autophagy and apoptosis: metabolic stress as a therapeutic option for prostate cancer. *Autophagy*, 2009, Vol. 5, no. 4, pp. 567-568.
15. Kuo M.T., Savaraj N., Feun L.G. Targeted cellular metabolism for cancer chemotherapy with recombinant arginine-degrading enzymes. *LG.Oncotarget.*, 2010, Vol. 1, no. 4, pp. 246-251.
16. Park I.-S., Kang S.-W., Shin Y.-J., Chae K.-Y., Park M.-O., Kim M.-Y., Wheatley D.N., Min B.-H. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *British Journal of Cancer*, 2003, Vol. 89, pp. 907-914.
17. Shen L.J., Lin W.C., Beloussow K., Hosoya K., Terasaki T., Ann D.K., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a differential modulator of inducible (iNOS) and endothelial (eNOS) nitric oxide synthetase activity in cultured endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.*, 2003, Vol. 66, no. 10, pp. 1945-1952.
18. Starikova E.A., Sokolov A.V., Vlasenko A.Y., Burova L.A., Freidlin I.S., Vasilyev V.B. Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochem. Cell Biol.*, 2016, Vol. 94, no. 2, pp. 129-137.
19. Stockbauer K.E., Magoun L., Liu M., Burns E.H., Gubba S., Renish S., Pan X., Bodary S.C., Baker E., Coburn J., Leong J.M., Musser J.M. A natural variant of the cysteine protease virulence factor of group A *Streptococcus* with an arginine-glycine-aspartic acid (RGD) motif preferentially binds human integrins $\alpha v \beta 3$ and $\alpha I I b \beta 3$. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1999, Vol. 96, pp. 242-247.

20. Yoshida J., Yoshimura M., Takamura S., Kobayashi S. Purification and characterization of an antitumor principle from *Streptococcus hemolyticus*, Su strain. *Jpn. J. Cancer. Res.*, 1985, Vol. 76, no. 3, pp. 213-223.
21. Yoshida J., Ishibashi T., Nishio M. Growth-inhibitory effect of a streptococcal antitumor glycoprotein on human epidermoid carcinoma A431 cells: involvement of dephosphorylation of epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.*, 2001, Vol. 61, no. 16, pp. 6151-6157.
22. Zhuo W., Song X., Zhou H., Luo Y. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans.*, 2011, Vol. 5, pp. 1376-1381.
23. Zuniga M., Perez G., Gonzalez-Candelas F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 2002, Vol. 2, no. 3, pp. 429-444.

Авторы:

Старикова Э.А. — к.б.н., старший научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Карасева А.Б. — научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Бурова Л.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник отдела молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Суворов А.Н. — д.м.н., заведующий отделом молекулярной микробиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Соколов А.В. — д.б.н., заведующий лабораторией, отдел молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Васильев В.Б. — д.м.н., заведующий отделом молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Фрейдлин И.С. — д.м.н., член-корр. РАН, главный научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Starikova E.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Karaseva A.B., Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Burova L.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Suvorov A.N., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Molecular Microbiology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Sokolov A.V., PhD, MD (Biology), Head of Laboratory, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Vasilyev V.B., PhD, MD (Medicine), Chief, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Freidlin I.S., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Main Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 04.07.2016
Отправлена на доработку 29.08.2016
Принята к печати 31.08.2016

Received 04.07.2016
Revision received 29.08.2016
Accepted 31.08.2016

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО СТАТУСА И НАЗАЛЬНОГО МИКРОБИОЦЕНОЗА ПРИ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ И АСТМАТИЧЕСКОЙ ТРИАДЕ

Лаптева А.М., Коленчукова О.А., Смирнова С.В.

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

Резюме. В статье приводится сравнительное исследование иммунологических показателей и микробиотенноза слизистой оболочки носа у пациентов при астматической триаде (АТ) и полипозном риносинусите (ПРС). Оценка показателей иммунитета проводилась с помощью методов проточной цитометрии и иммуноферментного анализа. Исследование микрофлоры слизистой оболочки носа проводили с помощью микробиологических методов. Анализ показателей иммунного статуса в группе ПРС показал повышение В-лимфоцитов, что может свидетельствовать об активации гуморального звена иммунитета, при снижении общего количества лимфоцитов и Т-хелперов. Также в группе ПРС обнаружено повышение концентрации IgE и снижение sIgA, сигнализирующее об угнетении мукозального иммунитета. В группе АТ выявлено повышение общего количества лейкоцитов и цитотоксических клеток, а также концентрации циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК), при этом снижен уровень натуральных киллеров и В-клеток. Таким образом, при АТ происходит повышение уровня Т-лимфоцитов за счет высокого содержания цитотоксических клеток на фоне снижения НК-лимфоцитов. При этом в группе АТ наблюдается низкий уровень В-лимфоцитов и, как следствие, снижение концентрации иммуноглобулинов IgG₄ и sIgA. Иммунный статус при полипозном риносинусите характеризуется активацией В-лимфоцитов при снижении Т-клеточного иммунитета, при этом с формированием развернутой астматической триады происходит изменение в иммуногенезе с активацией Т-лимфоцитов и снижением гуморального звена иммунитета. Изучение цитокинового профиля при ПРС и АТ показало разнонаправленный дисбаланс концентрации цитокинов: повышение концентрации провоспалительных (IFN γ , TNF α), противовоспалительных (IL-4) и снижение концентрации провоспалительных (IL-6) цитокинов при АТ по сравнению с группой ПРС. Активация, пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов находится под контролем IL-2, IL-6 и IL-4, при этом IL-10 и IFN γ , напротив, подавляют синтез иммуноглобулинов. При исследовании микробного пейзажа слизистой оболочки носа выявлено повышение общего количества микроорганизмов, а также бактерий рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterobacteriaceae* в группе ПРС относительно контроля. В группе АТ обнаружено увеличение общего количества бактерий, а также микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* относительно контроля. Таким образом, в группах ПРС и АТ выявлено повышение общего количества условно-патогенной микробной флоры на фоне снижения системного и местного иммунитета.

Ключевые слова: иммунитет, микробиотенноз, полипозный риносинусит, астматическая триада

Адрес для переписки:

Лаптева Анна Михайловна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
медицинских проблем Севера»
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62.
E-mail: nuraaa@rambler.ru

Address for correspondence:

Lapteva Anna M.
Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zheleznyak str., 3g.
Phone: 7 (391) 228-06-83, 228-06-81, 228-06-62.
E-mail: nuraaa@rambler.ru

Образец цитирования:

А.М. Лаптева, О.А. Коленчукова, С.В. Смирнова
«Особенности иммунного статуса и назального
микробиотенноза при полипозном риносинусите
и астматической триаде» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 6. С. 563–568.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-563-568

© Лаптева А.М. и соавт., 2016

For citation:

A.M. Lapteva, O.A. Kolenchukova, S.V. Smirnova "Immune
parameters and nasal microflora in patients with polypoid
rhinosinusitis and asthmatic triad", *Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya*, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 563–568.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-563-568

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-563-568>

IMMUNE PARAMETERS AND NASAL MICROFLORA IN PATIENTS WITH POLYPOID RHINOSINUSITIS AND ASTHMATIC TRIAD

Lapteva A.M., Kolenchukova O.A., Smirnova S.V.

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

Abstract. The article provides a comparative study of immunological parameters and microbiocenosis nasal mucosa in patients with the asthmatic triad (AT) and polypous rhinosinusitis (PRS). Performance evaluation of immunity carried out by flow cytometry and enzyme immunoassay. The study of the microflora of the nasal mucosa was performed by microbiological methods. Analysis of the immune status in the PRS showed an increase of B-lymphocytes, which may indicate the activation of humoral immunity, while reducing the total number of lymphocytes and T-helpers. Also in the group of PRS revealed increased concentration of IgE and decreased sIgA signals the oppression of mucosal immunity. In the group of the PRS found an increase of the total number of white blood cells and cytotoxic cells, and wherein the concentration of circulating immune complexes (CIC) reduced levels of natural killer cells and B-cells. Thus, the asthmatic triad increased levels of T-lymphocytes due to the high content of cytotoxic cells against decrease in NK-cells. In the AT group have low levels of B-lymphocytes, and as a consequence - reducing the concentration of immunoglobulin IgG4 and sIgA. Thus, the immune status with polypous rhinosinusitis is characterized by the activation of B-lymphocytes with a decrease in T-cell immunity, thus to form a deployed asthmatic triad immunogenesis change occurs with the activation of T-lymphocytes, and reduction in humoral immunity. The study of cytokine profile in PRS and AT showed mixed imbalance of cytokine concentration: increasing the concentration of pro-inflammatory ($\text{IFN}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$), anti-inflammatory (IL-4) and a decrease in the concentration of pro-inflammatory (IL-6) cytokines in asthmatic triad compared with a group of polypous rhinosinusitis. Activation, proliferation and differentiation of B-lymphocytes is under the control of IL-2, IL-6 and IL-4, while IL-10 and $\text{IFN}\gamma$ opposite suppress immunoglobulin synthesis. In the study of the microbial landscape of the nasal mucosa showed an increase of the total number of microorganisms and bacteria of the genus *Staphylococcus*, *Streptococcus* and *Enterobacteriaceae* in the both group. In the group of the PRS was found to increase the total amount of bacteria and microorganisms of the genus *Staphylococcus*, *Streptococcus* relative to control. Thus, the group revealed AT and PRS increase the total number of conditionally pathogenic microbial flora in the background to reduce the systemic and local immunity.

Keywords: immunity, microbiocenosis, polypoid rhinosinusitis, asthmatic triad

Введение

Частота сочетания полипозного риносинусита, непереносимости ненаркотических анальгетиков, нестероидных противовоспалительных средств и бронхиальной астмы давно привлекает внимание ученых и клиницистов [1, 2, 3]. Астматическая триада (АТ) — это клинический симптомокомплекс, характеризующийся полипозным риносинуситом, непереносимостью ненаркотических анальгетиков и нестероидных противовоспалительных средств и бронхиальной астмой. В основе формирования бронхоконстрикторного синдрома лежат неиммунологические механизмы, связанные с ингибированием циклоксигеназного пути метаболизма арахидоновой кислоты с гиперпродукцией лейкотриенов. Манифестация заболевания начинается с полипозного риносинусита и при отсутствии других проявлений АТ расценивается как неразвернутая астматическая триада [4, 5]. Несмотря на большое количество исследований, посвященных проблеме АТ, описаны только отдельные звенья ее патогенеза [6, 7, 8].

Иммунный ответ при аллергии сопровождается повреждением собственных тканей организма, а характер аллергического воспаления во многом определяется причиной, вызвавшей

его. Инициация иммунного ответа индуцируется цитокиновым профилем, влияющим и определяющим тип иммунного реагирования [2, 4]. Цитокины выполняют роль универсальных регуляторов межклеточных взаимодействий: регуляцию иммунных реакций, процессов пролиферации, миграции и дифференцировки клеток, координации функционирования иммунной системы.

Естественная микрофлора человека играет важную пусковую роль в механизме формирования иммунитета и неспецифических защитных реакций организма человека [9]. Наличие дисбактериоза ведет к нарушению функционального состояния иммунной системы. Тип иммунного реагирования зависит от изменения микробного пейзажа — степени и характера дисбактериоза. Естественно, при риносинуситах персистирующая условно-патогенная бактериальная микрофлора может модифицировать патогенетические механизмы заболевания и служить основой формирования хронического аллергического воспаления [10, 11].

Цель исследования: изучить особенности иммунного статуса, концентрации цитокинов и микробного пейзажа слизистой оболочки носа при полипозном риносинусите и астматической триаде.

Материалы и методы

Обследованы больные полипозным риносинуситом (ПРС, $n = 68$) и астматической триадой (АТ, $n = 32$) в возрасте от 18 до 64 лет. Группу контроля составляли практически здоровые доноры крови ГБУЗ «Красноярский краевой центр крови № 1» ($n = 219$), сопоставимые по полу и возрасту. Диагностика аллергического риносинусита основывалась на комплексном обследовании больных оториноларингологом и аллергологом-иммунологом. При постановке диагноза полипозного риносинусита и развернутой астматической триады использованы стандартные общеклинические методы с учетом дифференцированной диагностики атопических заболеваний и ринитов. Популяционный и субпопуляционный состав лимфоцитов крови оценивали с помощью проточной цитометрии с использованием моноклональных антител к $CD3^+$, $CD3^+/CD8^+$, $CD3^+/CD4^+$, $CD4^+/CD8^+$, $CD16^+/56^+$, $CD3^+/CD16^+/CD56^+$, $CD19^+$. Определение концентрации иммуноглобулинов IgA, IgM и IgG, IgE, sIgA, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄ и цитокинов (IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF α , и IFN γ , пг/мл) в сыворотке крови и назальном секрете определяли иммуноферментным методом. Концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяли с помощью турбидиметрического метода. Фагоцитоз определяли с помощью проточной цитометрии (Backman Coulter, FC 500, USA), при стимуляции нейтрофилов стафилококковым белком А, меченным FITC.

Для оценки микрофлоры слизистой оболочки носа во время обострения заболевания проводили посев микроорганизмов на питательных дифференциально-диагностических средах (КА, ЖСА, Эндо, энтерококк-агар). Назальный секрет забирали для дальнейшего исследования микрофлоры с помощью стерильных тупферов с коммерческой транспортной средой Эймса. Посев проводили секторным методом. Инкубировали в термостате при температуре 37 °C в течение 24 часов. Подсчет микроорганизмов проводили по расчетной таблице.

Право на проведение обследования юридически закреплялось информированным письменным согласием пациента. Протокол обследования больных и здоровых людей (контрольная группа) соответствовал этическим стандартам и был разрешен комитетом по биомедицинской этике НИИ МПС.

Статистическую обработку результатов осуществляли с помощью пакета прикладных программ Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., 2004). Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 25 и 75 перцентилей ($Q_{0,25}$ и $Q_{0,75}$). Нормальность распределения проверялась методом Колмогорова—Смирнова. Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали

по непараметрическому критерию Манна—Уитни. Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимался равным 0,05.

Результаты

Изучение клеточного звена иммунитета при ПРС относительно контроля показало увеличение общего количества лейкоцитов и процентного уровня $CD19^+$ клеток, при этом снижено процентное и абсолютное количество лимфоцитов и $CD4^+$ клеток. При АТ по сравнению с контрольной группой установлено повышение общего количества лейкоцитов и процентного содержания $CD8^+$ и снижение процентного и абсолютного количества $CD16^+$ и $CD19^+$ клеток.

При сравнении показателей клеточного звена иммунитета в группе АТ относительно ПРС обнаружено повышение процентного количества $CD3^+$ и $CD4^+$ клеток и снижение относительного уровня $CD16^+$ и $CD19^+$ лимфоцитов, а также снижение фагоцитарного числа.

При изучении гуморального звена иммунитета обнаружено увеличение концентрации IgE и снижение sIgA в группе ПРС по сравнению с контролем. При АТ по сравнению с группой контроля повышена концентрация ЦИК. Также обнаружено снижение концентрации IgG₄ и концентрации sIgA при АТ по сравнению с ПРС.

Исследование содержания цитокинов выявило увеличение концентрации IL-2 на местном и системном уровнях, IL-6 и IL-10 — в сыворотке крови и IFN γ — в назальных смывах при ПРС относительно контроля. В группе АТ по сравнению с контролем установлено увеличение концентрации IL-2, IL-4, IL-10, IFN γ и TNF α в назальном секрете и сыворотке крови и снижение IL-6 в сыворотке крови.

При сравнении уровней цитокинов при АТ по сравнению с ПРС выявлено повышение концентрации IL-4, IFN γ и TNF α и снижение IL-6 в сыворотке крови.

При исследовании микробного пейзажа выявлено повышение общего количества микроорганизмов, а также бактерий рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* и *Enterobacteriaceae* в группе ПРС относительно контроля. В группе АТ обнаружено увеличение общего количества бактерий, а также микроорганизмов рода *Staphylococcus*, *Streptococcus* относительно контроля.

Обсуждение

Таким образом, при астматической триаде происходит повышение уровня Т-лимфоцитов за счет высокого содержания цитотоксических клеток на фоне снижения NK-лимфоцитов по сравнению с полипозным риносинуситом. При этом в группе АТ наблюдается низкий уровень В-лимфоцитов и, как следствие, снижение концентрации иммуноглобулинов IgG₄ и sIgA.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ АСТМАТИЧЕСКОЙ ТРИАДЕ И ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ

Показатели	Контроль (n = 219)	ПРС (n = 68)	АТ (n = 37)
	1	2	3
Лейкоциты (10 ⁹ /л)	5,75 (4,25-7,25)	6,50 (4,75-8,50) P ₁₋₂ = 0,025	6,55 (5,50 - 8,05)
Лимфоциты (%)	39,0 (34,0-45,0)	32,0 (19,0-44,0) P ₁₋₂ < 0,001	28,0 (24,5-40,5) P ₁₋₃ < 0,001
Лимфоциты (10 ⁹ /л)	2,16 (1,60-3,00)	1,94 (1,23-2,83)	1,81 (1,3-2,79)
CD3 ⁺ (%)	67,0 (62,0-73,00)	63,00 (57,0-74,0)	69,5 (65,0-78,0)
CD3 ⁺ (10 ⁹ /л)	1,48 (1,08-2,04)	1,29 (0,74-1,70) P ₁₋₂ = 0,003	1,44 (0,95-2,13) P ₂₋₃ = 0,006
CD4 ⁺ (%)	42,18 (36,0-47,33)	36,00 (27,0-42,0) P ₁₋₂ < 0,001	43,0 (32,0-48,0)
CD4 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,81 (0,64-1,24)	0,69 (0,42-0,87) P ₁₋₂ = 0,004	0,84 (0,55-1,27) P ₂₋₃ = 0,026
CD8 ⁺ (%)	25,71 (22,0-29,42)	27,50 (22,0-35,0)	29,5 (25,0-35,0) P ₁₋₃ = 0,004
CD8 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,57 (0,35-0,79)	0,58 (0,33-0,82)	0,6 (0,44-0,7)
CD16 (%)	16,9 (13,0-22,0)	18,00 (9,0-23,0)	13,0 (11,0-16,0) P ₁₋₃ = 0,034; P ₂₋₃ = 0,038
CD16 (10 ⁹ /л)	0,35 (0,23-0,54)	0,34 (0,18-0,55) P ₁₋₂ = 0,035	0,21 (0,16-0,34) P ₁₋₃ = 0,007
CD19 (%)	15,01 (11,0-21,0)	18,00 (18,0-21,0) P ₁₋₂ = 0,047	12,0 (9,0-16,0) P ₁₋₃ = 0,038; P ₂₋₃ = 0,004
CD19 ⁺ (10 ⁹ /л)	0,33 (0,23-0,46)	0,35 (0,19-0,54)	0,23 (0,2-0,26) P ₁₋₃ = 0,007
CD3 ⁺ /CD4 ⁺	1,67 (1,2-2,1)	1,34 (0,94-1,78) P ₁₋₂ = 0,026	1,27 (0,94-1,92)
ЦИК	6,0 (3,0-9,0)	14,30 (10,5-33,6) P ₁₋₂ = 0,015	21,6 (14,8-31,4) P ₁₋₃ < 0,001
Фагоцитарное число	0,5 (0,1-0,5)	8,40 (4,5-9,20)	4,8 (3,2-5,3) P ₂₋₃ = 0,043
Фагоцитарный индекс	23,0 (10,0-25,0)	42,0 (28,0-78,0)	32,0 (24,0-48,0)

Примечание. P₁₋₂ – достоверные различия между группами контроля и ПРС; P₁₋₃ – достоверные различия между группами контроля и АТ; P₂₋₃ – достоверные различия между группами ПРС и АТ.

Секреторная составляющая иммунитета занимает центральное место в неотложной защите слизистой оболочки верхних дыхательных путей [12, 13]. В группе ПРС обнаружены повышенные концентрации IgE, что может быть проявлением атопии или гельминтозов и снижение sIgA, которое сигнализирует об угнетении мукозального иммунитета.

Изучение цитокинового профиля при ПРС и АТ показало разнонаправленный дисбаланс концентрации цитокинов: повышение концентрации провоспалительных (IFN γ , TNF α), противовоспалительных (IL-4) и снижение концентрации провоспалительных (IL-6) цитокинов при астматической триаде по сравнению с группой полипозного риносинусита. Активация, пролиферация и дифференцировка В-лимфоцитов находится под контролем IL-2, IL-6 и IL-4, при

этом IL-10 и IFN γ , напротив, подавляют синтез иммуноглобулинов [14, 15].

Увеличение количества микрофлоры слизистой оболочки носа свыше 10⁴ КОЕ/мл принято считать патологическим и рассматривать как одну из причин воспалительных процессов. В развитии воспалительного процесса на слизистой оболочке носа при ПРС и АТ принимают участие грамположительные кокки рода *Staphylococcus* и *Streptococcus*. Значительное увеличение микроорганизмов, относящихся к стрептококкам и стафилококкам, свидетельствует о снижении гуморального и клеточного иммунитета и развитии воспалительной реакции на слизистой оболочке носа. При этом увеличение концентрации энтеробактерий, являющихся условно-патогенной микрофлорой, при ПРС может свидетельствовать о дисбиотическом со-

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ ПРИ АСТМАТИЧЕСКОЙ ТРИАДЕ И ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ

Показатели	Контроль (n = 219)	ПРС (n = 68)	АТ (n = 37)
	1	2	3
IL-2 (кровь)	0,1 (0,1-0,1)	6,0 (0,1-30,0) $P_{1-2} = 0,001$	7,25 (6,33-15,22) $P_{1-3} < 0,001$
IL-2 (смывы)	0,1 (0,1-0,1)	8,4 (0,1-10,75) $P_{1-2} < 0,001$	8,1 (7,8-8,8) $P_{1-3} < 0,001$
IL-4 (кровь)	5,0 (0,1-8,0)	0,1 (0,1-7,75)	9,6 (8,3-14,07) $P_{1-3} = 0,002$; $P_{2-3} < 0,001$
IL-4 (смывы)	2,0 (0,1-8,0)	0,1 (0,1-9,75)	10,75 (9,0-11,15) $P_{1-3} = 0,012$
IL-6 (кровь)	2,0 (0,1-8,0)	6,6 (0,1-21,05) $P_{1-2} = 0,005$	0,1 (0,1-0,1) $P_{1-3} = 0,017$; $P_{2-3} = 0,002$
IL-6 (смывы)	0,1 (0,1-3,5)	3,0 (0,1-10,0)	0,1 (0,1-2,60)
IL-10 (кровь)	1,8 (0,1-2,4)	9,05 (5,25-13,9) $P_{1-2} = 0,016$	5,95 (3,5-7,4) $P_{1-3} = 0,005$
IL-10 (смывы)	0,1 (0,1-0,1)	8,8 (1,15-11,60) $P_{1-2} < 0,001$	13,55 (10,7-18,0) $P_{1-3} < 0,001$
IFN γ (кровь)	0,1 (0,1-0,1)	0,1 (0,1-29,6) $P_{1-2} = 0,011$	39,2 (29,4-32,0) $P_{1-3} < 0,001$; $P_{2-3} < 0,001$
IFN γ (смывы)	0,1 (0,1-0,1)	30,20 (0,1-31,0) $P_{1-2} = 0,006$	31,2 (28,8-33,5) $P_{1-3} < 0,001$
TNF α (кровь)	5,0 (2,0-20,0)	17,8 (0,1-27,8)	44,0 (32,2-45,3) $P_{1-3} < 0,001$; $P_{2-3} = 0,016$

Примечание. P_{1-2} – достоверные различия между группами контроля и ПРС; P_{1-3} – достоверные различия между группами контроля и АТ; P_{2-3} – достоверные различия между группами ПРС и АТ.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ МИКРОБНОГО ПЕЙЗАЖА ПРИ ПОЛИПОЗНОМ РИНОСИНУСИТЕ И АСТМАТИЧЕСКОЙ ТРИАДЕ

Показатели	Контроль (n = 219)	ПРС (n = 68)	РАТ (n = 37)
	1	2	3
<i>Staphylococcus</i>	10000 (1000-10110)	516000 (20000-863000) $P_{1-2} < 0,0001$	1000000 (500000-50000000) $P_{1-3} = 0,012$
<i>Streptococcus</i>	1000 (550-1000)	1000000 (500000-8000000) $P_{1-2} < 0,001$	500000 (50000-50000000) $P_{1-3} = 0,002$
<i>Enterococcus</i>	0	0	1000 (1000-1000)
<i>Micrococcus</i>	1000 (550-1000)	15000 (1000-50500) $P_{1-2} < 0,001$	0
<i>Enterobacteriaceae</i>	1000 (100-10000)	100000 (100000-1000000) $P_{1-2} < 0,001$	10000 (1000-500000)
Общее количество	15780 (1000-20800)	2183250 (1046600-6148500) $P_{1-2} < 0,001$	2104000 (1011000-20000000) $P_{1-3} = 0,003$

Примечание. P_{1-2} – достоверные различия между группами контроля и ПРС; P_{1-3} – достоверные различия между группами контроля и АТ; P_{2-3} – достоверные различия между группами ПРС и АТ.

стоянии слизистой оболочки носовых ходов. Слизистая оболочка носа – это биотоп, который не характерен для энтеробактерий, поэтому повышение концентрации данных микроорганизмов может расцениваться как ухудшение клинической картины заболевания.

Выводы

1. Иммунный статус при полипозном риносинусите характеризуется активацией В-лимфоцитов при снижении Т-клеточного иммунитета, при этом с формированием разверну-

той астматической триады происходит изменение в иммуногенезе с активацией Т-лимфоцитов и снижением гуморального звена иммунитета.

2. При неразвернутой астматической триаде (полипозный риносинусит) и в процессе формирования бронхиальной астмы неиммунного генеза наблюдается разнонаправленный дисбаланс

концентрации воспалительных и провоспалительных цитокинов.

3. На слизистой оболочке носа как при полипозном риносинусите, так и при астматической триаде имеет место выраженный дисбактериоз с преобладанием патогенной и условно-патогенной микрофлоры.

Список литературы / References

1. Битеева Д.В. Аспириновая бронхиальная астма в практике врача-аллерголога // Вестник семейной медицины, 2012. № 1. С. 24-29. [Biteeva D.V. Aspirin-induced asthma in practice allergist. *Vestnik semeynoy meditsiny* = *Bulletin of Family Medicine*, 2012, no. 1, pp. 24-29. (In Russ.)]
2. Бондарева Г.П., Терехова А.О. Роль инфекции в формировании полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой // Вестник оториноларингологии, 2010. № 3. С. 9-10. [Bondareva G.P., Terekhova A.O. The role of infection in the formation of polypoid rhinosinusitis in patients with bronchial asthma. *Vestnik otorinolaringologii* = *Bulletin of Otorhinolaryngology*, 2010, no. 3, pp. 9-10. (In Russ.)]
3. Игнатова И.А., Смирнова С.В., Покидышева Л.И. Аллергическая риносинусопатия у жителей Сибири и Севера. Новосибирск: Наука, 2005. 153 с. [Ignatova I.A., Smirnova S.V., Podkidysheva L.I. Allergic rhinosinusopathy in the inhabitants of Siberia and the North]. Novosibirsk: Science, 2005. 153 p.
4. Коленчукова О.А., Смирнова С.В., Савченко А.А. Особенности иммунитета у больных аллергическим риносинуситом в зависимости от иммунопатологической основы запуска аллергической реакции // Бюллетень ВЧШ СО РАМН, 2012. № 3. С. 83-87. [Kolenchukova O.A., Smirnova S.V., Savchenko A.A. Features of immunity in patients with allergic rhinosinusitis according to immunopathological bases run allergic edition. *Byulleten VSNTS SO RAMN* = *Bulletin of the East Siberian Scientific Center of Siberian Branch of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2012, no. 3, pp. 83-87. (In Russ.)]
5. Смирнова С.В., Зенкина Л.В., Игнатова И.А. Концентрация IL-2, IL-4, IL-6 и IFN-γ в сыворотке периферической крови и назальных смывах при респираторной атопии и псевдоатопии // Российский аллергологический журнал, 2005. № 1. С. 30-33. [Smirnova S.V., Zenkina L.V., Ignatova I.A. The concentration of IL-2, IL-4, IL-6 and IFN-γ in peripheral blood serum and nasal washes with respiratory atopy and pseudoatopy. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal* = *Russian Allergology Journal*, 2005, no. 1, pp. 30-33. (In Russ.)]
6. Смирнова С.В., Пыцкий В.И. Патогенез истинной аллергии и псевдоаллергии: учебно-методическое пособие. Красноярск, 2002. 21 с. [Smirnova S.V., Pitsky V.I. Pathogenesis of true allergy and pseudoallergy: teaching aid]. Krasnoyarsk, 2002. 21 p.
7. Шагарова С.Г., Смирнова С.В. Содержание некоторых цитокинов в сыворотке крови и назальных смывах у больных бронхиальной астмой // Цитокины и воспаление, 2010. Т. 9, № 4. С. 137-138. [Shagarova S.G., Smirnova S.V. The content of some cytokines in serum and nasal lavage in patients with bronchial asthma. *Tsitokiny i vospalenie* = *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 9, no. 4, pp. 137-138. (In Russ.)]
8. Цывкина А.А., Лусс Л.В., Царев С.В. Новые возможности консервативного лечения полипозного риносинусита у больных бронхиальной астмой // Российский аллергологический журнал, 2010. Т. 1, № 1. С. 204-205. [Tsivkina A.A., Lyss L.V., Tsarev S.V. New possibilities of conservative treatment of polypoid rhinosinusitis in patients with bronchial asthma. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal* = *Russian Allergology Journal*, 2010, Vol. 1, no. 1, pp. 204-205. (In Russ.)]
9. European Position Paper on Rhinosinusitis and Nasal Polyposis. *Rhinology*, 2007, Suppl. 20, p. 89.
10. Forster U. Strathmann S., Schafer D. Eicosanoid imbalance correlates *in vitro* with the pattern of clinical symptoms of Samter's triad. *Rhinology*, 2013, Vol. 51, no. 1, pp. 6-9.
11. Hutcheson P.S., Schubert M.S., Slavin R.G. Distinctions between allergic fungal rhinosinusitis and chronic rhinosinusitis. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2010, Vol. 24, no. 6, pp. 405-408.
12. Johns C.B., Laidlaw T.M. Elevated total serum IgE in nonatopic patients with aspirin-exacerbated respiratory. *Am. J. Rhinol. Allergy*, 2014, Vol. 28, no. 4, pp. 287-289.
13. Jorissen M. Nasal polyposis and myciliary transport. International Consensus on Nasal Polyposis. *Russian Rhinology*, 2006, no. 2, p. 30.
14. Laidlaw T.M., Cutler A.J., Kidder M.S. Prostaglandin E2 resistance in granulocytes from patients with aspirin-exacerbated respiratory disease. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 133, no. 6, pp. 169-701.
15. Wang J.H., Kwon H.J., Jang Y.J. Rhinovirus enhances various bacterial adhesions to nasal epithelial cells simultaneously. *Laryngoscope*, 2009, no. 119, pp. 1406-1411.

Авторы:

Лантева А.М. — аспирант очной формы обучения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Коленчукова О.А. — д.б.н., доцент, ведущий научный сотрудник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

Authors:

Lapteva A.M., PhD Student, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

Kolenchukova O.A., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Leading Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Поступила 08.07.2015

Отправлена на доработку 07.09.2015

Принята к печати 28.10.2015

Received 08.07.2015

Revision received 07.09.2015

Accepted 28.10.2015

РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 6 В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ, ВЫЗВАННОМ ПЕРЕНОСОМ АРТРИТОГЕННЫХ АНТИТЕЛ

Друцкая М.С.^{1,2}, Горшкова Е.А.^{1,2}, Жданова А.С.^{1,2,3},
Атретханы К.-С.^{1,2}, Гоголева В.С.^{1,2}, Зварцев Р.В.¹, Круглов А.А.^{1,2,3},
Недоспасов С.А.^{1,2,3}

¹ ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия

² ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

³ ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.Н. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Резюме. Интерлейкин 6 (IL-6) выполняет важные функции в регуляции иммунной системы, но в случае повышенной экспрессии он может способствовать развитию аутоиммунных заболеваний, таких как артрит. Системные блокаторы IL-6, основанные на моноклональных антителах к IL-6 или к специфической субъединице рецептора IL-6, уже применяются в клинике и дополнили арсенал биологических лекарств, среди которых наибольшее распространение получили блокаторы Фактора некроза опухолей (TNF). Ревматические заболевания и их экспериментальную терапию можно моделировать на мышах. В настоящей работе сообщается о повышенном уровне системного IL-6 при развитии артрита, вызванного переносом «патогенных» антител, а также об эффектах нейтрализации IL-6 моноклональными антителами против IL-6 мыши. Наши результаты указывают на патогенную роль двух цитокинов, TNF и IL-6, в экспериментальной модели артрита, индуцированного пассивным переносом антител к коллагену.

Ключевые слова: IL-6, экспериментальный артрит, перенос антител к коллагену, нейтрализующие антитела, TNF

ROLE OF IL-6 IN EXPERIMENTAL ARTHRITIS CAUSED BY TRANSFER OF ARTHRITOGENIC ANTIBODIES

Drutskaya M.S.^{a,b}, Gorshkova E.A.^{a,b}, Zhdanova A.S.^{a,b,c},
Atretkhany K.-S.^{a,b}, Gogoleva V.S.^{a,b}, Zvartsev R.V.^a, Kruglov A.A.^{a,b,c},
Nedospasov S.A.^{a,b,c}

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^b Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

^c Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Abstract. Interleukin-6 (IL-6) exerts important functions on immune regulation. In case of high expression, IL-6 may promote autoimmune disorders, e.g., arthritis. Systemic IL-6 blockers based on monoclonal

Адрес для переписки:

Друцкая Марина Сергеевна
ФГБУН «Институт молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта» РАН
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32.
Тел.: 8 (499) 135-99-64.
Факс: 8 (499) 135-14-05.
E-mail: marinadru@gmail.com

Address for correspondence:

Drutskaya Marina S.
V.A. Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian
Academy of Sciences
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilov str., 32.
Phone: 7 (499) 135-99-64.
Fax: 7 (499) 135-14-05.
E-mail: marinadru@gmail.com

Образец цитирования:

М.С. Друцкая, Е.А. Горшкова, А.С. Жданова,
К.-С. Атретханы, В.С. Гоголева, Р.В. Зварцев,
А.А. Круглов, С.А. Недоспасов «Роль интерлейкина 6
в экспериментальном артрите, вызванном переносом
артритогенных антител» // Медицинская иммунология,
2016. Т. 18, № 6. С. 569-574.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-569-574

© Друцкая М.С. и соавт., 2016

For citation:

M.S. Drutskaya, E.A. Gorshkova, A.S. Zhdanova,
K.-S. Atretkhany, V.S. Gogoleva, R.V. Zvartsev,
A.A. Kruglov, S.A. Nedospasov "Role of IL-6 in experimental
arthritis caused by transfer of arthritogenic antibodies",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 6, pp. 569-574.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-569-574

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-569-574>

antibodies against IL-6, or its specific receptor subunit, are already used in clinical settings, adding to a range of known biological drugs, such as, TNF blockers. Rheumatic disorders and their experimental therapy are reproducible in mice. This study revealed systemically increased levels of IL-6 in developing arthritis caused by transfer of pathogenic antibodies, as well as the effects of IL-6 neutralization by monoclonal antibodies against murine IL-6. Our results suggest a pathogenic role of the two cytokines, TNF and IL-6, in experimental arthritis induced by passive transfer of anti-collagen antibodies.

Keywords: interleukin-6, experimental arthritis, anti-collagen antibodies transfer, neutralizing antibodies, TNF

Работа поддержана грантом Российского научного фонда 14-25-00160.

Введение

Ревматические аутоиммунные заболевания затрагивают около 2% взрослого населения развитых стран. Существующие терапевтические схемы способны замедлить развитие артрита, снять некоторые его симптомы, улучшить качество жизни, но они не в состоянии элиминировать причину заболевания — наличие у пациента патогенных клонов лимфоцитов. Широкое применение в терапии ревматических заболеваний, таких как ревматоидный артрит и болезнь Бехтерева, получили блокаторы провоспалительных цитокинов — TNF, IL-6 и IL-1. К сожалению, эти терапевтические подходы эффективны не для всех пациентов, и поиск биомаркеров, способных предсказывать ответ на эту весьма дорогую терапию, по-прежнему является актуальной задачей. В настоящей работе была изучена связь системной продукции IL-6 с тяжестью экспериментального артрита, а также оценена роль TNF в этой модели заболевания.

Экспериментальный артрит у мышей можно вызвать несколькими способами. Во-первых, в некоторых мутантных линиях мышей заболевание развивается спонтанно и связано с повышенным уровнем продукции TNF [8, 10]. Во-вторых, артрит можно искусственно вызвать различными видами иммунизаций (например, коллагеном [3, 4] или пептидогликан-полисахаридными комплексами [11]. Считается, что при таком методе индукции болезни задействованы как Т-клеточные, так и В-клеточные механизмы. В-третьих, болезнь можно вызвать пассивным переносом антител к коллагену [7], предположительно минимизируя патогенную роль аутореактивных Т-клеток. В нашей работе использовали эту последнюю модель, одним из преимуществ которой была скорость развития заболевания (8-10 дней до пика заболевания у мышей линии BALB/c).

Интерлейкин 6 представляет собой иммунорегуляторный и провоспалительный цитокин, который сигнализирует через рецепторный комплекс, содержащий субъединицу gp130, вызывая активацию

вазию JAK-киназ и транскрипционных факторов семейства STAT [2]. Через эти же сигнальные каскады сигнализируют и многие другие цитокины, не только те, которые относятся к семейству IL-6. Предположительно у всех цитокинов есть уникальные невырожденные функции, которые можно выяснить методами обратной генетики или при фармакологической блокаде конкретного цитокина.

Одной из целей настоящей работы был поиск экспериментального заболевания, патогенез которого зависит от IL-6, для последующих исследований механизмов болезни и поиска возможных новых подходов к терапии.

Материалы и методы

Лабораторные животные

В работе использовали мышей линий BALB/c, C57Bl/6N, а также мышей с полным генетическим нокаутом TNF на генетической основе C57Bl/6N в возрасте 8-10 недель. Животных разводили и содержали в апатогенных (specific pathogen free) условиях на базе питомника для лабораторных животных SPF-категории «Пушино», ФИБХ РАН им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова.

Индукция экспериментального артрита

Мышам, достигшим 8-недельного возраста, внутрибрюшинно вводили коктейль моноклональных антител к коллагену (Chondrex, США) из расчета 75-250 мкг на 1 г веса, а на третий день вводили липополисахарид (Chondrex, штамм 0111:B4, США) из расчета 2,5 мкг на 1 г веса. Развитие симптомов заболевания оценивали ежедневно по ранее опубликованной методике [1]. Вкратце: в зависимости от тяжести симптомов каждую из четырех конечностей оценивали по шкале от 0 до 4 баллов, тем самым максимально возможная оценка тяжести артрита на мышь составляла 16 баллов. Первые проявления заболевания отмечали на 3-4 день, пик развития заболевания приходился на 8-10 день, после чего мышей подвергали эвтаназии, собирали кровь и органы для дальнейшего гистологического, иммунофлуоресцентного и цитофлуориметрического анализа.

Гистология суставов

Коленные суставы очищали от прилегающей мышечной ткани и фиксировали в 4% растворе параформальдегида в течение суток. Затем ткань промывали фосфатно-солевым буфером, pH = 7,4 в течение часа и помещали в 20% раствор EDTA на 7 суток при температуре 37 °C для удаления кальция из костной ткани. Декальцифицированную ткань далее промывали в течение суток в проточной воде, после чего обезвоживали в спиртах восходящей концентрации: 70% этанол, 96% этанол, изопропанол и хлороформ, выдерживали 18 часов в 50% растворе парафина (Paraplast, Leica) в хлороформе и переводили в парафин при температуре 56 °C на 5 суток. Из ткани, залитой в парафиновых гистологических блоках, изготавливали фронтальные срезы толщиной 7 мкм при помощи ротационного микротомы SLEE CUT 4055. Готовые срезы окрашивали железным гематоксилином Вейгерта, красителем Fast Green и Сафранином О для исследования морфологии синовиальной мембраны сустава и оценки стадии дегенерации хряща.

Анализ IL-6 в сыворотке крови

На 10 день эксперимента у мышей собирали кровь и получали сыворотку. Концентрацию IL-6 в сыворотке оценивали методом ИФА с использованием набора для IL-6 мыши ELISA Ready-SET-Go! (eBioscience, США), следуя протоколу производителя.

Цитометрия

Суспензию клеток селезенки инкубировали в буфере для лизиса эритроцитов, отмывали, после чего полученные спленоциты инкубировали с антителами к рецептору Fc-gamma (клон 2.4G2) из расчета 1×10^6 клеток в 100 мкл фосфатного буфера, содержащего 1% Fetal Bovine Serum (FBS), далее клетки осаждали центрифугированием, отмывали и инкубировали с антителами к Gr-1-FITC (R86-8C5) и CD11b-Cy5 (клон M1/70), а также с Viability Dye-APC-Cy7 (eBioscience, USA). Цитофлуориметрический анализ проводили на приборе FACS Canto II, а анализ данных в программе Flow Jo.

Статистический анализ

Для статистического анализа данных использовали программу GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Данные представлены в виде средних значений и стандартного отклонения для каждой группы мышей. Статистически значимые различия определяли с помощью t-критерия Стьюдента или U-критерия Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически достоверными при уровне значимости $P \leq 0,05$.

Результаты

Отработка модели экспериментального артрита, вызываемого пассивным переносом антител к коллагену, в мышах на генетической основе BALB/c и C57BL/6

Нашей целью является установление механизмов патогенеза заболеваний, связанных с экспрессией некоторых цитокинов, включая TNF и IL-6, а также разработка новых подходов к их фармакологической блокаде. В настоящей работе мы опробовали и валидировали новую для лаборатории модель индукции артрита. Эта модель позволяет использовать в экспериментах мышей с разной генетической основой, в частности мышей C57BL/6 с генетическим нокаутом TNF [9] и мышей линии BALB/c, характеризующихся повышенной чувствительностью к артриту, вызванному переносом антител к коллагену [1].

Известно, что TNF является патогенным фактором при разных формах артрита, как у людей, так и у экспериментальных животных. Тем не менее в литературе отсутствуют сообщения о роли TNF в конкретной модели артрита, вызываемом переносом артритогенных антител. Как следует из рисунка 1, и в этой модели роль TNF критична для развития болезни, так как мыши с полным генетическим дефицитом TNF не проявляют симптомов заболевания (рис. 1А).

Ход развития артрита, а также сравнение гистологических препаратов суставов мышей дикого типа и мышей, дефицитных по TNF, на 10 день заболевания показаны на рисунке 1Б и составляют главные феноменологические характеристики этой экспериментальной модели артрита. Кроме того, с помощью проточной цитометрии нами проводилось иммунопрофилирование некоторых типов клеток, получаемых из лимфоидных органов здоровых и больных мышей (данные не показаны).

Появление и уровни IL-6 в сыворотке крови мышей с артритом коррелируют с развитием и тяжестью заболевания

В двух группах мышей — развивших и не развивших болезнь (рис. 1В) — были определены уровни IL-6 в сыворотке крови, причем он оказался высоким у мышей дикого типа и практически не определялся у мышей, дефицитных по TNF (рис. 1Г), или у здоровых мышей, не получивших артритогенных антител (не показано).

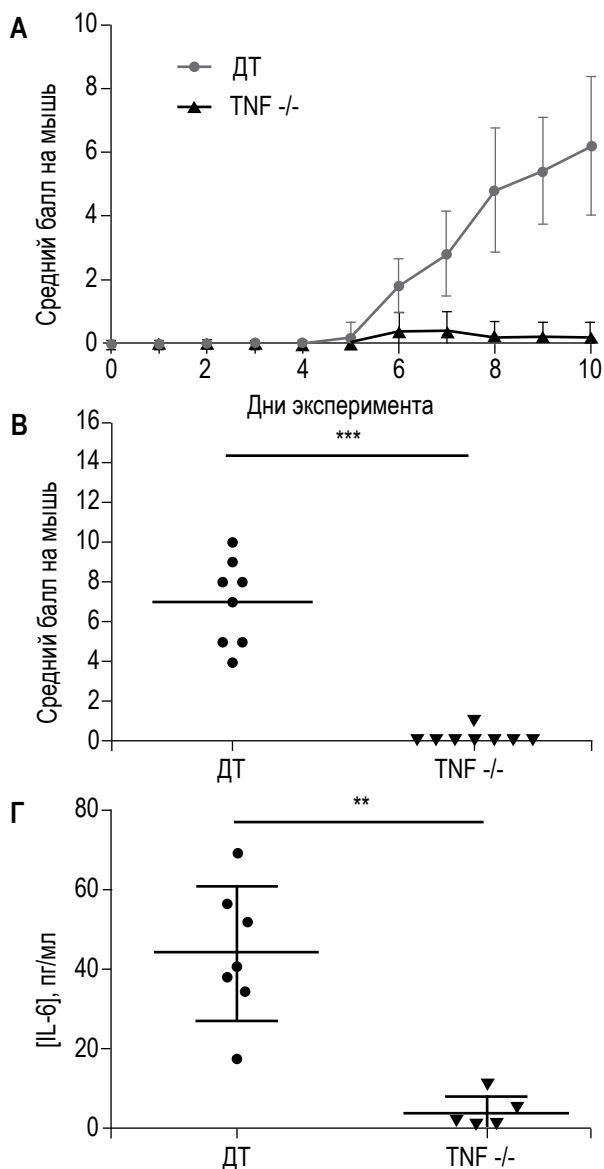


Рисунок 1. Мыши, дефицитные по TNF, не развивают артрит, индуцированный пассивным переносом антител к коллагену

Примечание. (А) Динамика развития артрита у мышей дикого типа (ДТ) и мышей, дефицитных по TNF (TNF^{-/-}), данные представлены в виде средних значений на группу (n = 5) ±SD. (Б, см. 3-ю стр. обложки) Гистология коленных суставов при окрашивании Fast Green и Сафранином О. В отличие от TNF^{-/-} мышей у мышей ДТ наблюдается потеря окрашивания хряща Сафранином О (красный цвет, отмечено синей стрелкой), свидетельствующая о его деградации, а также гиперплазия синовиальной оболочки и инфильтрация клеток (отмечено красной стрелкой). Изображения получены на микроскопе Leica DM4000 B LED при 50X увеличении (объектив Leica N Plan 5x 0.12). Оценку тяжести симптомов заболевания (В) и концентрацию IL-6 в сыворотке (Г) у мышей ДТ и TNF^{-/-} мышей проводили на десятый день эксперимента. P ≤ 0,001 (**); P ≤ 0,0001 (***).

В следующей серии экспериментов (рис. 2А, Б) мы стратифицировали BALB/c мышей, развивающих болезнь, на две группы — с тяжелым артритом и с умеренной формой болезни в за-

висимости от вводимой концентрации артритогенных антител из расчета 150 и 75 мкг на г веса мыши соответственно. Оказалось, что уровень IL-6 в сыворотке коррелировал с тяжестью заболевания, в то время как у здоровых мышей системный уровень IL-6 практически не детектировался (рис. 2В). Мы также отметили корреляцию тяжести артрита с процентным содержанием воспалительных моноцитов в селезенке больных и здоровых мышей (рис. 2Г).

Фармакологическая блокировка IL-6 мыши моноклональными антителами приводит к снижению симптомов заболевания

Сам факт присутствия высоких уровней провоспалительного цитокина IL-6 у мышей с артритом еще не означает, что IL-6 напрямую связан с патогенезом болезни. Для установления причинной роли IL-6 в этой модели артрита в следующем эксперименте сравнивали две группы мышей, получивших артритогенные антитела, — те, которым дополнительно внутрибрюшинно вводили антитела, нейтрализующие IL-6 мыши, из расчета 250 мкг на мышь каждые три дня, и те, которые получали инъекции фосфатного буфера (контрольная группа). Оказалось, что нейтрализация IL-6 моноклональными антителами значительно снижает симптомы болезни (рис. 3), что прямо указывает на патогенную роль IL-6 в этом модельном заболевании, не зависящем от Т-клеток. Интересно, что патологическая роль IL-6 была ранее продемонстрирована в другой экспериментальной модели артрита, индуцированного иммунизацией коллагеном, в которой IL-6 способствовал дифференцировке аутореактивных Th17-клеток, а его ингибирование приводило к снижению патогенеза артрита [6].

Обсуждение

Конечной целью программы исследований нашей лаборатории является разработка новых методов антицитокиновой терапии, основанном на глубоком молекулярном анализе механизмов развития болезни. На начальном этапе нам было необходимо валидировать экспериментальную модель заболеваний, которые зависят от одного или нескольких провоспалительных цитокинов — TNF, IL-6 и IL-1. Поскольку цитокины могут регулировать экспрессию других цитокинов, то патогенная роль нескольких цитокинов в одном заболевании может быть связана через взаимную регуляцию.

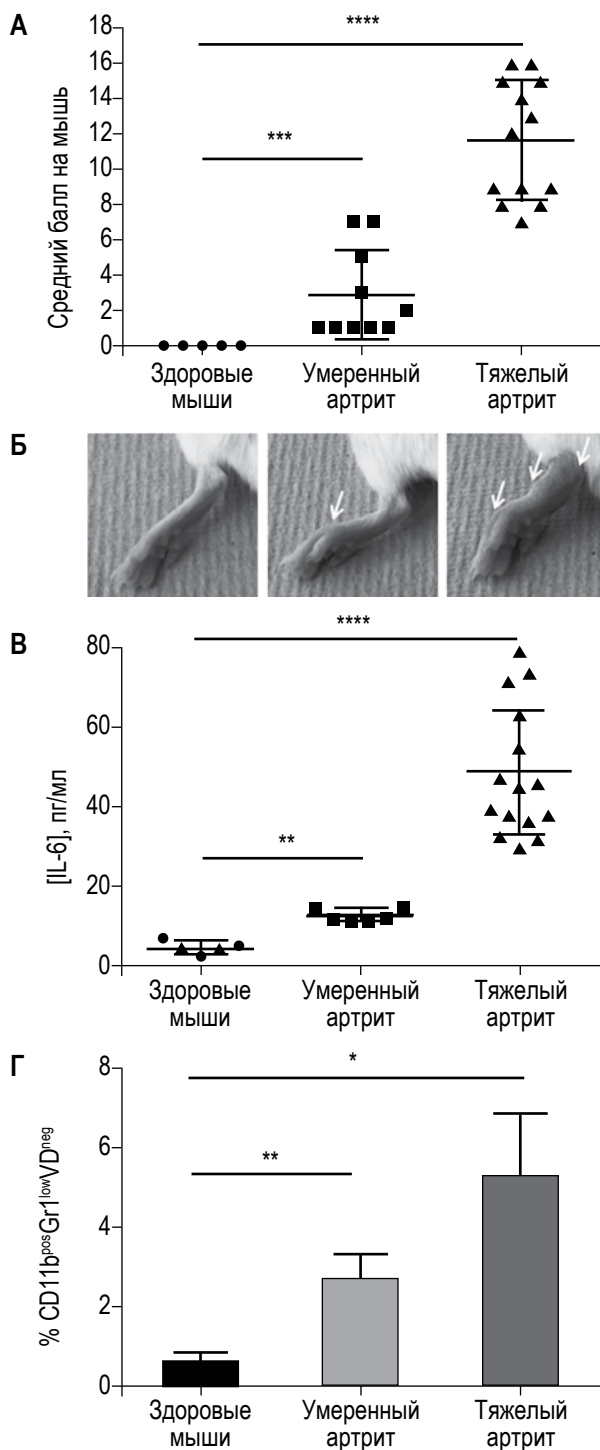


Рисунок 2. У мышей линии BALB/c развитие артрита коррелирует с повышенной продукцией IL-6 в сыворотке и повышенным содержанием воспалительных моноцитов в селезенке на десятый день эксперимента

Примечание. Оценку тяжести симптомов заболевания (А) проводили макроскопически у мышей с умеренной и тяжелой формой артрита, в зависимости от вводимой дозы артритагенных антител, а также у здоровых мышей (Б). Концентрацию IL-6 в сыворотке определяли методом ИФА (В), а процентное содержание CD11b^{pos}Gr-1^{low}Vβ^{neg} воспалительных моноцитов в селезенке – методом цитофлуориметрии (Г). $P \leq 0,05$ (*); $P \leq 0,001$ (**); $P \leq 0,0001$ (***); $P \leq 0,00001$ (****).

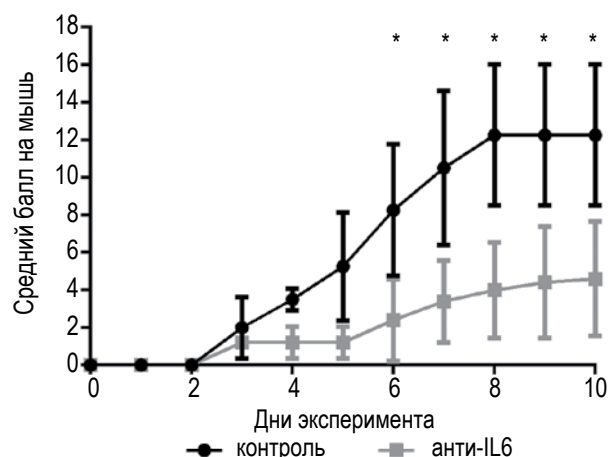


Рисунок 3. Фармакологическая блокировка IL-6 значительно снижает симптомы артрита, индуцированного пассивным переносом антител к коллагену

Примечание. Показана динамика развития артрита у мышей линии Balb/C на фоне нейтрализации IL-6 моноклональными антителами (анти-IL-6, клон MP5-20F3), которые вводили внутривенно из расчета 250 мкг/мышь каждые три дня. Контрольная группа мышей (контроль) получала внутривенные инъекции фосфатно-солевого буфера каждые три дня. Данные представлены в виде средних значений на группу ($n = 5$) $\pm$ SD; $P \leq 0,05$ (*).

В настоящей работе нами отработана модель артрита, основанная на переносе коктейля моноклональных артритагенных антител к коллагену [7]. Поскольку патогенные антитела поступают в организм «в готовом виде», предполагается, что в этой модели роль Т-клеток минимальна, хотя этот вопрос и требует дальнейшего изучения.

Оказалось, что такой вид экспериментального артрита зависит как минимум от двух цитокинов – TNF и IL-6. Без дополнительных экспериментов мы не можем ответить на вопрос, являются ли вклады этих двух цитокинов независимыми, или они вовлечены во взаимную регуляцию. В любом случае отработанная IL-6 зависимая модель заболевания позволяет нам теперь применить весь арсенал методов обратной генетики и определить клеточные источники патогенного IL-6 в артрите. Если таким источником будет служить только один основной вид клеток, то нашим следующим шагом будет разработка биспецифических антител, лимитирующих действие цитокина только из конкретного клеточного источника. Принципиальную возможность такого подхода мы обосновали в недавней работе с TNF [5].

Благодарности

Авторы благодарят Д.В. Купраша за критические замечания.

Список литературы / References

1. Друцкая М.С., Ефимов Г.А., Зварцев Р.В., Чашчина А.А., Чудаков Д.М., Тиллиб С.В., Круглов А.А., Недоспасов С.А. Экспериментальные модели артрита для изучения действия блокаторов фактора некроза опухолей // Биохимия, 2014. Т. 79, № 12. С. 1647-1656. [Drutskaya M.S., Efimov G.A., Zvartsev R.V., Chashchina A.A., Chudakov D.M., Tillib S.V., Kruglov A.A., Nedospasov S.A. Experimental models of arthritis in which pathogenesis is dependent on TNF expression. *Biokhimiya = Biochemistry*, 2014 Vol. 79, no. 12, pp. 1349-1357. (In Russ.)]
2. Друцкая М.С., Носенко М.А., Атретханы К.-С.Н., Ефимов Г.А., Недоспасов С.А. Интерлейкин-6 – от молекулярных механизмов передачи сигнала к физиологическим функциям и терапевтическим мишеням. Молекулярная биология, 2015. Т. 49, № 6. С. 1-7. [Drutskaya M.S., Nosenko M.A., Atretkhany K.S., Efimov G.A., Nedospasov S.A. [Interleukin-6 From molecular mechanisms of signal transduction to physiological properties and therapeutic targeting]. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology*, 2015, Vol. 49, no. 6, pp. 937-943. (In Russ.)]
3. Bevaart L., Vervoordeldonk M.J., Tak P.P. Collagen-induced arthritis in mice. *Methods in Molecular Biology*, 2010, no. 602, pp. 181-192.
4. Brand D.D., Latham K.A., Rosloniec E.F. Collagen-induced arthritis. *Nature Protocols*, 2007, Vol. 2, no. 5, pp. 1269-1275.
5. Efimov G.A., Kruglov A.A., Khlopchatnikova Z.V., Rozov F.N., Mokhonov V.V., Rose-John S., Scheller J., Gordon S., Stacey M., Drutskaya M.S., Tillib S.V., Nedospasov S.A. Cell-type-restricted anti-cytokine therapy: TNF inhibition from one pathogenic source. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2016, Vol. 113, pp. 3006-3011.
6. Fujimoto M., Serada S., Mihara M., Uchiyama Y., Yoshida H., Koike N., Ohsugi Y., Nishikawa T., Rippe B., Kimura A., Kishimoto T., Naka T. Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis Rheumatology*, 2008, Vol. 58, no. 12, pp. 3710-3719.
7. Hutamekalin P., Saito T., Yamaki K., Mizutani N., Brand D.D., Waritani T., Terato K., Yoshino S. Collagen antibody-induced arthritis in mice: development of a new arthritogenic 5-clone cocktail of monoclonal anti-type II collagen antibodies. *Journal of Immunological Methods*, 2009, Vol. 343, no. 1, pp. 49-55.
8. Keffer J., Probert L., Cazaris H., Georgopoulos S., Kaslaris E., Kiousis D., Kollias G. Transgenic mice expressing human tumour necrosis factor: a predictive genetic model of arthritis. *EMBO Journal*, 1991, Vol. 10, no. 13, pp. 4025-4031.
9. Kuprash D.V., Tumanov A.V., Liepinsh D.J., Koroleva E.P., Drutskaya M.S., Kruglov A.A., Shakhov A.N., Southon E., Murphy W.J., Tessarollo L., Grivennikov S.I., Nedospasov S.A. Novel tumor necrosis factor-knockout mice that lack Peyer's patches. *European Journal of Immunology*, 2005, Vol. 35, no. 5, pp. 1592-1600.
10. Lacey D., Hickey P., Arhatari B.D., O'Reilly L.A., Rohrbach L., Kiriazis H., Du X.J., Bouillet P. Spontaneous retrotransposon insertion into TNF 3'UTR causes heart valve disease and chronic polyarthritis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 2015, Vol. 112, no. 31, pp. 9698-9703.
11. Li X., Bradford B.U., Dalldorf F., Goyert S.M., Stimpson S.A., Thurman R.G., Makarov S.S. CD14 mediates the innate immune responses to arthropathogenic peptidoglycan-polysaccharide complexes of Gram-positive bacterial cell walls. *Arthritis Research and Therapy*, 2004, Vol. 6, no. 3, pp. R273-281.

Авторы:

Друцкая М.С. — к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия
Горшкова Е.А. — лаборант, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия
Жданова А.С. — лаборант, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва; ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.Н. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия
Атретханы К.-С. — младший научный сотрудник, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия
Гоголева В.С. — лаборант, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия
Зварцев Р.В. — младший научный сотрудник, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН, Москва, Россия
Круглов А.А. — к.б.н., старший научный сотрудник, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва; ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.Н. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия
Недоспасов С.А. — д.б.н., член-корр. РАН, главный научный сотрудник, ФГБУН «Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта» РАН; кафедра иммунологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва; ФГАОУ ВО «Нижегородский государственный университет им. Н.Н. Лобачевского», г. Нижний Новгород, Россия

Поступила 06.09.2016

Отправлена на доработку 19.09.2016

Принята к печати 22.09.2016

Authors:

Drutskaya M.S., PhD (Biology), Senior Research Associate, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Gorshkova E.A., Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Zhdanova A.S., Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Atretkhany K.-S., Junior Research Associate, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Gogoleva V.S., Assistant, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Zvartsev R.V., Junior Research Associate, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kruglov A.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Nedospasov S.A., PhD, MD (Biology), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Head Research Associate, Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences; Department of Immunology, Biological Faculty, Lomonosov Moscow State University, Moscow; Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

Received 06.09.2016

Revision received 19.09.2016

Accepted 22.09.2016

ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АЦИПЕНСИНА 1 В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА

Умнякова Е.С.¹, Кудрявцев И.В.^{1,4}, Грудинина Н.А.¹, Баландин С.В.²,
Болосов И.А.², Пантелеев П.В.², Филатенкова Т.А.¹, Орлов Д.С.^{1,3},
Цветкова Е.В.^{1,3}, Овчинникова Т.В.², Кокряков В.Н.^{1,3}, Шамова О.В.^{1,3}

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

² ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академ. М.М. Шемакина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

³ Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

⁴ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Поиск новых соединений, обеспечивающих доставку лекарственных препаратов в инфицированные или опухолевые клетки, является актуальной задачей биомедицинских исследований. К числу таких соединений относятся проникающие в клетки пептиды (Cell-Penetrating Peptides), которые легко транслоцируются через мембраны эукариотических клеток и могут служить переносчиками разнообразных терапевтических агентов в клетки. Целью данной работы явилось изучение способности антимикробного пептида системы врожденного иммунитета — аципенсина 1 — проникать в опухолевые клетки человека *in vitro*. Аципенсин 1 — катионный пептид, выделенный нами ранее из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*. В рамках данного исследования впервые установлено, что аципенсин 1 может проникать в эукариотические клетки без их повреждения. Разработана процедура получения рекомбинантного препарата аципенсина 1, проведена конъюгация пептида с флуоресцентным маркером BODIPY FL. С использованием конфокальной микроскопии показано, что меченый аципенсин 1 быстро транслоцируется в клетки эритромиелоидного лейкоза человека линии К-562 и детектируется во внутриклеточном пространстве уже через 5 мин после добавления его в культуру клеток. С помощью проточной цитометрии изучена кинетика проникновения меченых пептидов (в нетоксических микромолярных концентрациях) в клетки К-562, получены данные о быстрой интернализации меченого пептида в исследуемые клетки, подтверждающие результаты микроскопического анализа: несущий флуоресцентную метку пептид выявлялся в клетках К-562 через 2–3 секунды после внесения препарата инкубационную среду, максимум флуоресценции достигался на сроке около 45 секунд, с дальнейшим выходом «на плато» на сроках свыше 100 секунд после стимуляции клеток исследуемым соединением. Установленные факты подтверждают концепцию о том, что антимикробные пептиды врожденного иммунитета обладают свойствами проникающих в клетки пептидов, а также позволяют рассматривать исследуемый антимикробный пептид аципенсин 1 как перспективное соединение, на основе которого могут быть разработаны новые лекарствен-

Адрес для переписки:

Умнякова Екатерина Сергеевна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, г. Санкт-Петербург,
ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (981) 971-49-75.
E-mail: umka-biolog@mail.ru

Address for correspondence:

Umnyakova Ekaterina S.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg,
Akad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (981) 971-49-75.
E-mail: umka-biolog@mail.ru

Образец цитирования:

Е.С. Умнякова, И.В. Кудрявцев, Н.А. Грудинина,
С.В. Баландин, И.А. Болосов, П.В. Пантелеев,
Т.А. Филатенкова, Д.С. Орлов, Е.В. Цветкова,
Т.В. Овчинникова, В.Н. Кокряков, О.В. Шамова
«Интернализация антимикробного пептида аципенсина 1
в опухолевые клетки человека» // Медицинская
иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 575–582.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-575-582
© Умнякова Е.С. и соавт., 2016

For citation:

E.S. Umnyakova, I.V. Kudryavtsev, N.A. Grudinina,
S.V. Balandin, I.A. Bolosov, P.V. Panteleev, T.A. Filatenkova,
D.S. Orlov, E.V. Tsvetkova, T.V. Ovchinnikova,
V.N. Kokryakov, O.V. Shamova "Internalization of
antimicrobial peptide acipensin 1 into human tumor cells",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2016, Vol. 18, no. 6, pp. 575–582.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-575-582
DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-575-582>

ные препараты с повышенной способностью проникать в клетки-мишени, участвующие в патологических процессах и, следовательно, с более высокой эффективностью терапевтического действия.

Ключевые слова: проникающие в клетки пептиды, антимикробные пептиды, аципенсин 1

INTERNALIZATION OF ANTIMICROBIAL PEPTIDE ACIPENSIN 1 INTO HUMAN TUMOR CELLS

Umnyakova E.S.^a, Kudryavtsev I.V.^{a,d}, Grudinina N.A.^a,
Balandin S.V.^b, Bolosov I.A.^b, Panteleev P.V.^b, Filatenkova T.A.^a,
Orlov D.S.^a, Tsvetkova E.V.^a, Ovchinnikova T.V.^b, Kokryakov V.N.^{a,c},
Shamova O.V.^{a,c}

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

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

^c St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Search for new compounds providing delivery of drugs into infected or neoplastic cells, is an important direction of biomedical research. Cell-penetrating peptides are among those compounds, due to their ability to translocate through membranes of eukaryotic cells, serving as potential carriers of various therapeutic agents to the target cells. The aim of present work was to investigate the ability of acipensin 1, an antimicrobial peptide of innate immune system, for *in vitro* penetration into human tumor cells. Acipensin 1 is a cationic peptide that we have previously isolated from leukocytes of the Russian sturgeon, *Acipenser gueldenstaedtii*. Capability of acipensin 1 to enter the human erytroleukemia K-562 cells has been investigated for the first time. A biotechnological procedure for producing a recombinant acipensin 1 peptide has been developed. The obtained peptide was conjugated with a fluorescent probe BODIPY FL. By means of confocal microscopy, we have shown that the tagged acipensin 1 rapidly enters into K-562 cells and can be detected in the intracellular space within 5 min after its addition to the cell culture. Using flow cytometry technique, penetration kinetics of the labeled peptide into K-562 cells (at nontoxic micromolar concentrations) has been studied. We have observed a rapid internalization of the peptide to the target cells, thus confirming the results of microscopic analysis, i.e. the labeled acipensin was detectable in K-562 cells as soon as within 2-3 seconds after its addition to the incubation medium. The maximum of fluorescence was reached within a period of approx. 45 seconds, with further “plateau” at the terms of >100 seconds following cell stimulation with the test compound. These data support the concept, that the antimicrobial peptides of innate immunity system possess the features of cell-penetrating peptides, and allow us to consider the studied sturgeon peptide a promising template for development of new drugs with increased ability to enter the cells implicated into pathological processes, and, therefore, higher therapeutic efficiency.

Keywords: cell-penetrating peptides, antimicrobial peptides, acipensin 1

Работа поддержана грантом ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014-2020 годы» (соглашение № 14.604.21.0104). Уникальный идентификатор RFMEFI60414X0104.

Поиск путей доставки лекарственных соединений в клетки входит в число актуальных задач медицинской иммунологии, связанных с лечением инфекционных заболеваний, в частности вызываемых микроорганизмами, имеющими внутриклеточную локализацию, а также

с терапией опухолевых заболеваний. Одним из подходов для решения данной задачи является использование соединений, способствующих переносу лекарственных препаратов через мембраны клеток-мишеней. К числу таких соединений принадлежат проникающие в клетки пептиды (Cell Penetrating Peptides – CPP). CPP имеют различные происхождение и структуру. Для большинства CPP характерен высокий положительный заряд молекулы, а также наличие значительного количества гидрофобных аминокислотных остатков. Многие CPP являются

фрагментами белков вирусов, растений, животных. Примерами подобных пептидов являются: ТАТ, представляющий собой фрагмент капсидного белка вируса иммунодефицита человека, пептид VP22 — фрагмент белка вируса простого герпеса, пенетратин или рАНТР — фрагмент белка, участвующего в регуляции процессов развития дрозиды, и другие пептиды [2, 6]. На основе природных структур разработаны и синтезированы химерные молекулы, обладающие способностью транслоцироваться через мембрану клеток млекопитающих, а также переносить в клетки разнообразные лекарственные препараты, имеющие внутриклеточные мишени: siRNA, антисмысловые олигонуклеотиды, плазмиды, наночастицы различной природы, липосомы, разнообразные противоопухолевые или противомикробные лекарственные агенты [3, 4, 9]. Однако известно, что многие CPP обладают и побочными эффектами, в частности могут нарушать функционирование мембранных белков нормальных клеток организма, вызывать аллергические реакции [6, 8] и т.д. Некоторые пептиды подвергаются быстрой деградации в биологических жидкостях [6]. Поэтому поиск новых эффективных CPP с оптимальными для практического применения свойствами в настоящее время является актуальной задачей биомедицинских исследований,

Целью данной работы явилось изучение способности недавно открытого нами антимикробного пептида системы врожденного иммунитета — аципенсина 1 — проникать в эукариотические клетки. Аципенсин 1 (Ac1) — пептид, выделенный из лейкоцитов русского осетра *Acipenser gueldenstaedtii*, является производным гистона H2A, имеет молекулярную массу 5336 kDa, включает 51 аминокислотный остаток, в том числе 13 положительно заряженных остатков аргинина и лизина (при отсутствии отрицательно заряженных), а также 10 остатков гидрофобных аминокислот (валина, лейцина, тирозина, фенилаланина) [7]. Подобные признаки характерны для многих CPP, что позволило предположить, что аципенсин обладает и сходными функциональными свойствами. В пользу этого предположения свидетельствовали и данные по наличию свойств CPP у ряда антимикробных пептидов врожденного иммунитета позвоночных, в частности буфорина [10]. В задачи нашей работы входило получение рекомбинантного Ac1, конъюгация его с флуорофором и исследование его

способности интернализироваться в клетки человека в культуре.

Получение рекомбинантного препарата аципенсина 1

Экспрессирующую плазмиду pET-His8-TrxL-Ac1p1 получали путем лигирования BglII/XhoI-фрагмента плазмиды pET-31b(+) (Novagen) со вставкой, кодирующей T7lac промотор, участок связывания рибосомы и гибридный белок His8-TrxL-Ac1. Последний состоял из восьми остатков гистидина, последовательности тиоредоксина (белка-носителя) и участка, соответствующего целевому пептиду Ac1. Искусственный ген получали химическим синтезом набора олигонуклеотидных фрагментов с последующей сборкой и амплификацией промежуточных и конечного продуктов при помощи полимеразной цепной реакции (ПЦР). Матрицей для амплификации последовательности тиоредоксина служила плаزمида pET-32a(+) (Novagen). Методом направленного мутагенеза при помощи ПЦР на стадии сборки была осуществлена замена кодона, кодирующего Met37 (ATG) в составе тиоредоксина, на лейциновый кодон (CTG).

Экспрессию гена гибридного белка проводили в клетках *E. coli* BL21 (DE3), трансформированных плазмидой pET-His8-TrxL-Ac1. Трансформанты выращивали в жидкой питательной среде LB с добавлением 20 мМ глюкозы и 100 мкМ ампициллина до плотности культуры $OD_{600} \sim 0,7$, после чего индуцировали экспрессию добавлением 0,2 мМ изопропилтио-D-галактопиранозидом (IPTG) и продолжали инкубацию при температуре 30 °C в течение 4 ч. Далее клеточную массу осаждали центрифугированием и проводили ресуспендирование и ультразвуковой лизис клеток в фосфатном буфере (pH 7,8), содержащем 6 М гидрохлорид гуанидина. Гибридный белок очищали на колонке с Ni-сефарозой (Amersham) в системе буферов, содержащих 6 М гидрохлорид гуанидина, обессоливали с помощью диализа и подвергали лиофилизации. Навеску гибридного белка растворяли в трифторуксусной кислоте и расщепляли бромцианом в течение 12 ч. Реакцию останавливали добавлением избытка воды и упариванием на вакуумной центрифуге. Белок-носитель удаляли путем повторной металлохелатной хроматографии. В качестве финальной стадии очистки использовали метод обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (ОФ ВЭЖХ) на колонке ReproSil-Pur C18-AQ (Германия) в линейном градиенте ацетонитри-

ла от 5 до 80% в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Гомогенность полученных образцов и содержание в них целевых пептидов подтверждали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле и масс-спектрометрии МАЛДИ.

Конъюгация аципенсина 1 с флуоресцентным зондом BODIPY FL (SE)

К 500 мг Ас-1 добавляли 500 мкг флуорофора BODIPY FL SE (N-гидроксисукцинимидный эфир 4,4-дифтор-5,7-диметил-4-бора-3а,4а-диаза-8-индацен-3-пропионовой кислоты (возбужд. 503 нм, испуск. 512 нм) фирмы Invitrogen, США) в 0,15 М натрий-карбонатном буфере, рН = 8,3. Конъюгацию проводили в течение 24 ч при +25 °С на роторной мешалке при низкой скорости вращения (35 об/мин). Реакцию останавливали, добавляя трифторуксусную кислоту до конечной концентрации 0,1%. Далее производили очистку меченого продукта (Ас1-BOBIPY) от несвязавшегося пептида и других нежелательных продуктов реакции с помощью ОФ ВЭЖХ на колонке Vydac-C18 (США) в линейном градиенте ацетонитрила от 10 до 60% в присутствии 0,1% трифторуксусной кислоты. Белковый состав полученных фракций анализировали с помощью аналитического электрофореза в полиакриламидном геле. Концентрацию пептидов, конъюгированных с BODIPY FL, определяли спектрофотометрически согласно рекомендациям производителя флуорофора.

Клеточные культуры

В работе использовали клетки эритромиелоидного лейкоза человека линии К-562, поставляемые фирмой Биолот (Россия). Клетки культивировали в среде RPMI 1640, дополненной глутамином, гентамицином и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (Биолот, Россия), при 37 °С в атмосфере 5% CO₂.

Методы исследования проникновения аципенсина 1 через мембраны опухолевых клеток

Конфокальная микроскопия

Связывание и интернализацию меченого аципенсина 1 (Ас1-BODIPY) в клетки-мишени (K562) выявляли при помощи инвертированного конфокального лазерного сканирующего микроскопа «LSM 510 Meta» (Zeiss, Германия), с иммерсионным объективом PlanApoChromat 63/1.4 Oil. Клеточные суспензии переносили в пластиковые пробирки по 80 000 клеток на про-

бу в объеме 50 мкл. Затем к этим суспензиям добавляли Ас1-BODIPY до конечной концентрации 25 мкМ. Инкубировали при температуре 37 °С в течение 5, 15 или 40 минут, затем клетки осаждали центрифугированием, отмывали от избытка несвязавшегося пептида и препараты (без фиксации) немедленно использовали для микроскопического анализа распределения меченого пептида в клетках-мишенях.

Для возбуждения флуоресценции BODIPY FL использовали лазер с длиной волны 488 нм, для детекции — фильтр более 505 нм. В проходящем свете изображения получали с использованием метода дифференциально-интерференционного контраста (DIC). Изображения сохраняли в базе данных LSM с последующим конвертированием в JPEG-формат.

Проточная цитометрия

Интернализацию меченого пептида в клетки-мишени (клетки линии K562) количественно оценивали с помощью проточной цитофлуориметрии по увеличению величины сигнала зелёной флуоресценции (BODIPY FL, Ex/Em 503/512) на проточных цитофлуориметрах Navios™ и CytoFlex™ (Beckman Coulter, США). Суспензии клеток К-562 переносили в пластиковые пробирки по 200 000 клеток на пробирку в объеме 100 мкл. Затем к клеточным суспензиям добавляли несущий флуоресцентную метку Ас1 до конечной концентрации 25 мкМ. Пробирки помещали в термостат и инкубировали в течение 0, 15, 30, 60 минут при 37 °С, после чего клетки осаждали центрифугированием (300 g 7 минут), отмывали от избытка несвязавшегося пептида (учитывая время, потраченное на центрифугирование и подготовку пробы, наименьшую длительность инкубации при анализе данных принимали за 5 мин). К осадку клеток добавляли по 300 мкл фосфатно-солевого буфера и за 3 мин до исследования вносили раствор трипанового синего до конечной концентрации 40 мкг/мл. Трипановый синий служил в качестве «гасителя» флуоресценции BODIPY FL [12], который, не проникая внутрь живых клеток, элиминировал сигнал от конъюгатов пептида и BODIPY, находящихся на поверхности клеток-мишеней. Далее проводили цитофлуориметрический анализ на приборе Navios™ (Beckman Coulter, США). Для каждого из образцов анализировали не менее 20 000

одиноким клеткам. Чтобы отличить отдельные клетки от агрегатов и в последующем дискриминировать агрегаты из анализа, использовали следующие сочетания сигналов по прямому (величина, пропорциональная размеру клеток) и боковому (величина, характеризующая структуру клеток) светорассеянию: интенсивность пикового против интенсивности интегрального сигналов по FS или SS, а также время полета против интенсивности интегрального сигналов FS или SS. Для анализа интернализации Ac1-BODIPY в клетки K-562 в режиме реального времени проводили измерения на проточном цитофлуориметре CytoFlex™ (Beckman Coulter, США). Внесение Ac1-BODIPY (до конечной концентрации 25 мкМ) в суспензию клеток осуществляли на 40 секунды после начала анализа образца на приборе. Статистическую обработку данных проводили в программе Excel. Результаты представлены как среднее и ошибки среднего показателей интенсивности флуоресценции по данным 3-х измерений.

Результаты и обсуждение

С использованием конфокальной микроскопии показано, что несущий флуоресцентную метку аципенсин (Ac1-BODIPY) быстро проникает через мембраны клеток-мишеней. Пептид детектировался внутри клеток K-562 уже после 5 мин инкубации (рис. 1А).

Через 15 и 40 мин меченый Ac1 продолжал накапливаться в клетках (рис. 1 Б, В). При использовании пептида в исследуемой концентрации существенных признаков повреждения клеток не наблюдалось.

Таким образом, установлено, что аципенсин 1, конъюгированный с флуорофором BODIPY FL, проникает в клетки и выявляется во внутриклеточном пространстве уже через 5 мин. Пептид детектируется преимущественно в цитоплазме клеток. Сходные результаты, свидетельствующие о быстром проникновении пептида, конъюгированного с флуорофором, получены с помощью проточной цитофлуориметрии.

Использование проточной цитофлуориметрии позволило количественно оценить эффективность интернализации пептидов в исследуемые клетки. Изучена кинетика проникновения меченых пептидов (в нетоксических микромолярных концентрациях) в клетки K-562. Анализ полу-

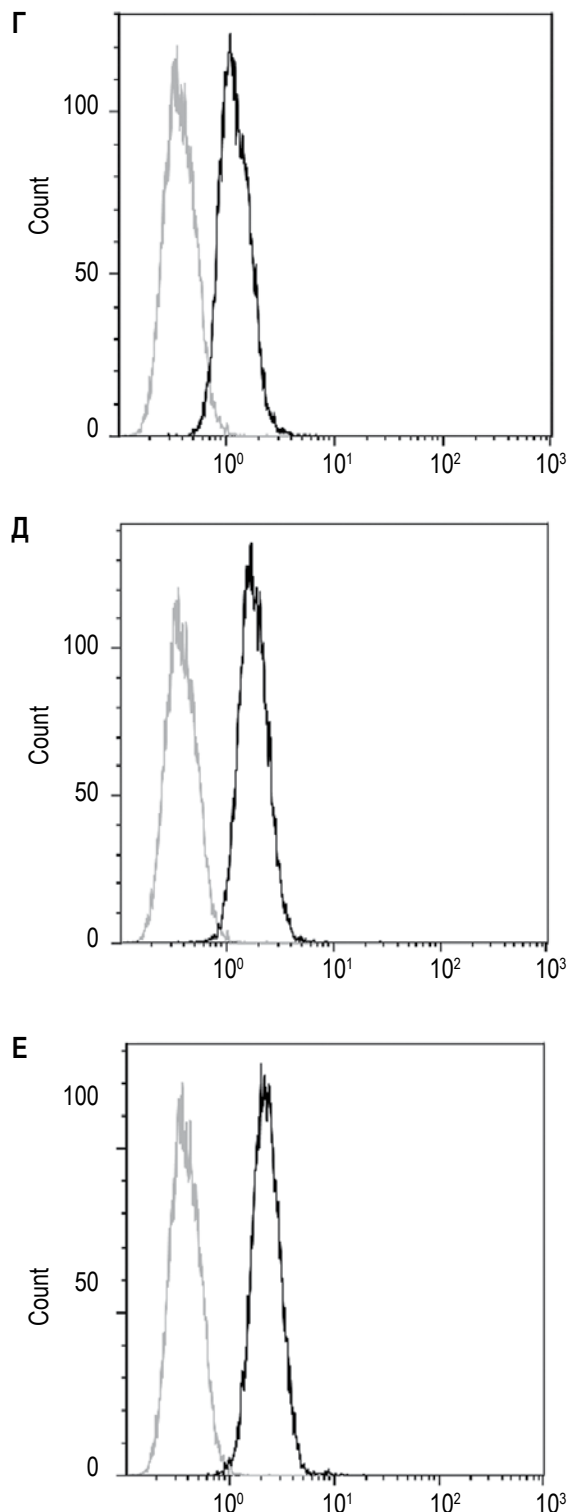


Рисунок 1. Гистограммы, полученные при проведении проточной цитометрии образцов Ac1-BODIPY на приборе Navios™ после инкубации пептида с клетками в течение 5 мин (Г), 15 мин (Д), 40 мин (Е): по оси абсцисс – интенсивность флуоресценции меченого пептида, по оси ординат – количество клеток, обладающих определенной интенсивностью флуоресценции

Примечание. Рисунки А, Б, В см. на 3-й стр. обложки.

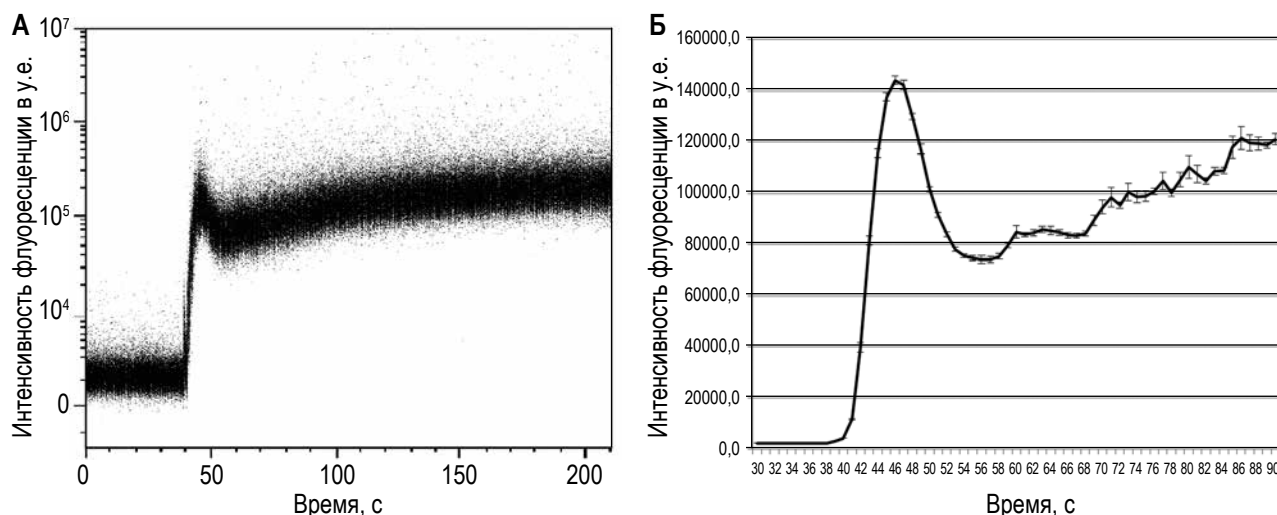


Рисунок 2. Анализ динамики включения Ac1-BODIPY в клетки линии К-562 по результатам проточной цитофлуориметрии на приборе CytoFlex™

Примечание. Гистограмма А – кинетика проникновения Ac1-BODIPY (25 мкМ) в клетки. По оси абсцисс – время, с (внесение Ac1-BODIPY осуществляли на 40 секунде после начала анализа образца), по оси ординат – интенсивность флуоресценции Ac1-BODIPY, проникшего через плазматическую мембрану клеток линии К-562, условные единицы (MFI).

Гистограмма Б – результаты статистической обработки данных проточной цитометрии, полученных на интервале 30-90 секунд после начала эксперимента (внесение Ac1-BODIPY осуществляли на 40 секунде после начала анализа образца), результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего для каждой из точек, n = 3.

ченных результатов проводили с применением программного обеспечения Kaluza™ (Beckman Coulter, США). Результаты измерений представлены на рисунке 1 (Г-Е) в виде гистограмм распределения клеток по интенсивности флуоресценции. Приведены типичные гистограммы, полученные при анализе проб, содержащих клеточные суспензии, инкубировавшиеся с пептидом в течение различных временных интервалов – в соответствии со сроками инкубации при микроскопических исследованиях (рис. 1А-В, см. 3-ю стр. обложки).

Таким образом, полученные данные подтверждают, что аципенсин 1, несущий флуоресцентную метку, быстро проникает в клетки К-562 и детектируется в них уже через 5 мин после его внесения в культуру клеток. Для более детального анализа эффективности проникновения аципенсина 1 через плазматическую мембрану клеток была проведена серия динамических экспериментов, результаты одного из которых приведены на рисунке 2. Полученные данные указывают на то, что исследованный пептид, конъюгированный с флуорофором, детектируется в составе клеток уже через 2-3 секунды после внесения препарата в среду для культивирования клеток. Максимум флуоресценции достигается на сроке 46 секунд, после чего имеет место некоторое

снижение флуоресценции клеток с дальнейшим выходом «на плато» на сроках свыше 100 секунд после стимуляции клеток исследуемой конструкцией.

Результаты исследования находятся в соответствии с описанными в литературе, хотя и немногочисленными данными по аналогичным свойствам других антимикробных пептидов врожденного иммунитета позвоночных: буфорина 2 – пептида из кожи жабы, представляющего собой, как и аципенсин, производное гистона H2A [5]; кателицидина человека LL-37, фрагментов бактенецина Vac7 быка [11], бактенецина ChVac5 козы, протегрина 1 свиньи [1] и др., для которых подтверждена способность проникать в эукариотические клетки. Подобная активность впервые показана нами для пептида из лейкоцитов осетра. Одним из преимуществ исследуемого соединения по сравнению с вышеперечисленными пептидами является то, что в работе применялся рекомбинантный препарат пептида, полученный в результате разработанной авторами биотехнологической процедуры, позволяющей получать данное соединение в больших количествах, что является немаловажным в свете перспективы практического применения этого вещества. Следующим этапом проводимой работы будет создание

конъюгатов АсI с различными антимикробными или противоопухолевыми соединениями и изучение способности АсI содействовать переносу этих соединений в инфицированные или опухолевые клетки.

Заключение

Впервые установлено свойство антимикробного пептида лейкоцитов русского осетра — аципенсина I — транслоцироваться в эукариотические клетки. Полученные данные подтверждают

концепцию о том, что антимикробные пептиды врожденного иммунитета обладают свойствами проникающих в клетки пептидов (CPP), а также позволяют рассматривать исследуемый пептид осетра как перспективное соединение, на основе которого могут быть разработаны новые лекарственные препараты с повышенной способностью проникать в клетки-мишени, участвующие в патологических процессах и, следовательно, с более высокой эффективностью терапевтического действия.

Список литературы / References

1. Шамова О.В., Сакута Г.А., Орлов Д.С., Зенин В.В., Штейн Г.И., Колодкин Н.И., Афонина И.Н., Кокряков В.Н. Действие антимикробных пептидов из нейтрофильных гранулоцитов на опухолевые и нормальные клетки в культуре // Цитология, 2007. Т. 49, № 12. С. 1000-1010. [Shamova O.V., Sakuta G.A., Orlov D.S., Zenin V.V., Shtein G.I., Kolodkin N.I., Afonina I.V., Kokriakov V.N. Effects of antimicrobial peptides of neutrophils on tumor and normal cells in culture. *Tsitologiya = Cytology*, 2007, Vol. 49, no. 12, pp. 1000-1010. (In Russ.)]
2. Chugh A., Eudes F., Shim Y.S. Cell-penetrating peptides: nanocarrier for macromolecule delivery in living cells. *IUBMB Life*, 2010, Vol. 62, no. 3, pp. 183-193.
3. Dinca A., Chien W.M., Chin M.T. Intracellular Delivery of proteins with cell-penetrating peptides for therapeutic uses in human disease. *Int. J. Mol. Sci.*, 2016, Vol. 17, no. 2, p. 263.
4. Johnson R.M., Harrison S.D., Maclean D. Therapeutic applications of cell-penetrating peptides. *Methods in Molecular Biology*, 2011, Vol. 683, pp. 535-551.
5. Park C., Yi K., Matsuzaki K., Kim M., Kim S. Structure-activity analysis of buforin II, a histone H2A-derived antimicrobial peptide: the proline hinge is responsible for the cell-penetrating ability of buforin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, Vol. 97, pp. 8245-8250.
6. Reissmann S. Cell penetration: scope and limitations by the application of cell-penetrating peptides. *J. Pept. Sci.*, 2014, Vol. 20, no. 10, pp. 760-784.
7. Shamova O.V., Orlov D.S., Balandin S.V., Shramova E.I., Tsvetkova E.V., Panteleev P.V., Leonova Yu.F., Tagaev A.A., Kokryakov V.N. Ovchinnikova Acipensins – novel antimicrobial peptides from leukocytes of the Russian sturgeon *Acipenser gueldenstaedtii*. *Acta Naturae*, 2014, Vol. 6, no. 4, pp. 99-109.
8. Soomets U., Lindgren M., Gallet X., Hällbrink M., Elmquist A., Balaspiri L., Zorko M., Pooga M., Brasseur R., Langel U. Deletion analogues of transportan. *Biochim. Biophys. Acta*, 2000, Vol. 1467, no. 1, pp. 165-176.
9. Sparr C., Purkayastha N., Kolesinska B., Gengenbacher M., Amulic B., Matuschewski K., Seebach D., Kamena F. Improved efficacy of fosmidomycin against *Plasmodium* and *Mycobacterium* species by combination with the cell-penetrating peptide octaarginine. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2013, Vol. 57, no. 10, pp. 4689-4698.
10. Splith K., Neundorff I. Antimicrobial peptides with cell-penetrating peptide properties and vice versa. *Eur. Biophys. J.*, 2011, Vol. 40, pp. 387-397.
11. Tomasinsig L., Skerlavaj B., Papo N., Giabbai B., Shai Y., Zanetti M. Mechanistic and functional studies of the interaction of a proline-rich antimicrobial peptide with mammalian cells. *J. Biol. Chem.*, 2006, Vol. 281, pp. 383-391.
12. van Amersfoort E.S., van Strijp J.A. Evaluation of a flow cytometric fluorescence-quenching assay of phagocytosis of sensitized sheep erythrocytes by polymorphonuclear leukocytes. *Cytometry*, 1994, Vol. 17, no. 4, pp. 294-301.

Авторы:

Умнякова Е.С. — аспирант, научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

Umnyakova E.S., PhD Student, Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

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

Грудинина Н.А. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Баландин С.В. — к.х.н., научный сотрудник Учебно-научного центра ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Болосов И.А. — младший научный сотрудник Учебно-научного центра ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Пантелеев П.В. — к.х.н., младший научный сотрудник Учебно-научного центра ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Филатенкова Т.А. — аспирант, младший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Орлов Д.С. — к.м.н., доцент, старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Цветкова Е.В. — к.б.н., старший научный сотрудник ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; доцент, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Овчинникова Т.В. — д.х.н., доцент, заведующая отделом «Учебно-научный центр» ФГБНУ «Институт биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, Москва, Россия

Кокряков В.Н. — д.б.н., профессор, заведующий лабораторией отдела общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Шамова О.В. — д.б.н., доцент, заведующая отделом общей патологии и патофизиологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; профессор, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Grudinina N.A., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Balandin S.V., PhD (Chemistry), Research Associate, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Bolosov I.A., Junior Research Associate, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Panteleev P.V., PhD (Chemistry), Junior Research Associate, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Filatenkova T.A., PhD Student, Junior Research Associate, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Orlov D.S., PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Tsvetkova E.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Institute of Experimental Medicine; Associate Professor, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Ovchinnikova T.V., PhD, MD (Chemistry), Associate Professor, Head, Research Educational Centre, M.M. Shemyakin and Yu.A. Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

Kokryakov V.N., PhD, MD (Biology), Professor, Head of Laboratory, Department of General Pathology and Pathological Physiology; Professor, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Shamova O.V., PhD, MD (Biology), Associate Professor, Head, Department of General Pathology and Pathological Physiology; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 03.09.2016

Отправлена на доработку 06.09.2016

Принята к печати 08.09.2016

Received 03.09.2016

Revision received 06.09.2016

Accepted 08.09.2016

РЕТРОСПЕКТИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ У ДЕТЕЙ В СВЕРДЛОВСКОЙ ОБЛАСТИ

Дерябина С.С.^{1, 2, 3}, Тузанкина И.А.^{2, 3, 4}, Власова Е.В.⁴, Лаврина С.Г.⁵,
Шершневу В.Н.^{3, 6}

¹ ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка», г. Екатеринбург, Россия

² ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

³ ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

⁴ ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

⁵ ФГБУ «Федеральный научный клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии
им. Дмитрия Рогачева», Москва, Россия

⁶ ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. С целью обоснования необходимости внедрения массового обследования новорожденных на первичные иммунодефицитные состояния (ПИД) методом определения количества копий кольцевых участков ДНК Т-клеточного (TREC) и В-клеточного (KREC) рецепторов лимфоцитов проведено ретроспективное исследование архивных образцов крови детей (n = 43), умерших на первом году жизни. Выраженное снижение количества TREC и (или) KREC выявлено в 16 случаях (37,0%). Клиническая картина и обнаружение микроделеции 22q11.2 у одного ребенка подтвердили диагноз ПИД. Еще в 5 образцах обнаружены изменения нуклеотидной последовательности ДНК в гене *RAG1*: два варианта миссенс-замены Lys820Arg и His249Arg (для трех образцов в гетерозиготном состоянии и для одного — в компаундном) и один уникальный, ранее не описанный вариант — с. 1315C>G (Leu439Val) в гетерозиготном состоянии. Совокупность клинических, гематологических и молекулярно-генетических данных позволяет ретроспективно верифицировать первичную иммунную недостаточность в рассматриваемых случаях. В результате проведенного исследования подтверждена необходимость внедрения метода определения TREC/KREC в программы неонатального скрининга на ПИД для их своевременной диагностики и лечения.

Ключевые слова: тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН), первичные иммунодефициты (ПИД), TREC, KREC, массовое обследование новорожденных, ретроспективная диагностика

RETROSPECTIVE DIAGNOSIS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCIES FOR CHILDREN IN SVERDLOVSK REGION

Deryabina S.S.^{a, b, c}, Tuzankina I.A.^{b, c, d}, Vlasova E.V.^d, Lavrina S.G.^e,
Shershnev V.N.^{c, f}

^a Medical Centre “Healthcare of Mother and Child”, Yekaterinburg, Russian Federation

^b Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

^c B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

^d Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

^e D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^f Institute of Industrial Ecology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. In order to justify a need for mass screening of primary immunodeficiencies (PID) in a regional program for the newborns, we performed a retrospective study of blood spots (archived screening cards) from

Адрес для переписки:

Дерябина Светлана Степановна
ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана
здоровья матери и ребенка»
620041, Россия, г. Екатеринбург, ул. Флотская, 52.
Тел./факс: 8 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Address for correspondence:

Deryabina Svetlana S.
Medical Centre “Healthcare of Mother and Child”
620041, Russian Federation, Yekaterinburg,
Flotskaya str., 52.
Phone/Fax: 7 (343) 374-31-10.
E-mail: ssderyabina@gmail.com

Образец цитирования:

С.С. Дерябина, И.А. Тузанкина, Е.В. Власова, С.Г. Лаврина,
В.Н. Шершневу «Ретроспективная диагностика первичных
иммунодефицитных состояний у детей в Свердловской
области» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6.
С. 583–588. doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588

For citation:

S.S. Deryabina, I.A. Tuzankina, E.V. Vlasova,
S.G. Lavrina, V.N. Shershnev “Retrospective diagnosis
of primary immunodeficiencies for children in Sverdlovsk
Region”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 583–588.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588

© Дерябина С.С. и соавт., 2016

DOI: http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-583-588

the babies who deceased at the first year of life ($n = 43$). To this purpose, the copy numbers of T-cell receptor excision circles (TREC) and kappa-deleting recombination excision circles (KREC) have been measured. Notably decreased levels of TREC and (or) KREC were revealed in 16 cases (37.0%). Typical clinical pattern and presence of 22q11.2 deletion confirmed a PID diagnosis (DiGeorge syndrome) in one case. In five additional cases, the *RAG1* gene defects have been detected, i.e., His249Arg (two heterozygous patients in our study), and Lys820Arg variants (one heterozygous case, and one compound heterozygote) have been observed in our group. Moreover, one novel mutation was revealed in heterozygous state, i.e., c.1315C>G (Leu439Val). A synopsis of clinical patterns, hematological data, immunological testing and molecular biology could establish the PID diagnosis in these cases. Hence, we have confirmed a need for introduction of TREC and KREC determination in neonatal PID screening programs, aiming for their timely diagnostics and treatment.

Keywords: severe combined immunodeficiency (SCID), primary immunodeficiency (PID), TREC, KREC, newborn screening, retrospective diagnosis

Работа выполнена при финансовой поддержке постановления № 211 Правительства Российской Федерации, контракт № 02.A03.21.0006.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Введение

Начиная с XX века обществу стали доступны эффективные способы лечения некоторых видов наследственной патологии, позволяющие избежать летального исхода и предотвратить развитие тяжелой инвалидности у ребенка, если заболевание выявлено до начала его клинических проявлений. Самый простой и перспективный метод ранней диагностики таких болезней — массовое обследование новорожденных, или неонатальный скрининг. Эта новейшая технология позволяет не только выявлять больных младенцев на доклинической стадии заболевания и своевременно начинать лечение, но также формировать «группы риска» детей, нуждающихся в медико-генетическом наблюдении и обследовании на носительство мутантного гена, с обязательным выходом на пренатальную диагностику в семьях с отягощенным анамнезом [2]. На сегодняшний день программы неонатального скрининга внедрены более чем в 50 государствах мира и насчитывают около 45 скринируемых наследственных заболеваний (нозологий).

За последнее десятилетие в практику здравоохранения многих стран активно внедряется определение универсального маркера Т-клеточных иммунодефицитов — TREC (T-cell receptor excision circle) [14]. TREC формируются в процессе V(D)J-реаранжировки, когда часть генетического материала вырезается и замыкается в кольцо. В ходе пролиферации клеток иммунной системы такие эксцизионные кольца остаются в одной из дочерних клеток, что позволяет использовать определение их количества как показатель функциональной активности тимуса — его способности продуцировать Т-лимфоциты и тем самым рассматривать TREC как суррогатный маркер нормального развития иммунной системы [4]. Аналогично образуются KREC (kappa-deleting recombination excision circles) — В-клеточные эксцизионные кольца,

наличие которых в В-лимфоците является показателем эффективности развития В-клеточного звена иммунной системы в процессе эмбриогенеза. Методика использования данных маркеров для неонатального скрининга стартовала в 2008 году в штате Висконсин (США) [14]. С тех пор количество стран с государственной Программой массового обследования новорожденных на тяжелую комбинированную иммунную недостаточность (ТКИН) неуклонно растет [12]. Обследование основано на количественном анализе TREC и KREC методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) в реальном времени, которое также весьма эффективно и для диагностики других состояний, связанных с дефицитом Т- или В-клеток [13]. Сниженные уровни TREC/KREC (или их полное отсутствие) позволяют немедленно откорректировать объем терапевтических или оперативных вмешательств (трансплантация гемопоэтических стволовых клеток, ферментозаместительная и генная терапии), предупредив развитие тяжелых инфекций, аутоиммунных и других воспалительных заболеваний.

В 2013 году в России разработан отечественный набор реагентов для количественного одновременного определения копий TREC и KREC, который может применяться для оценки эффективности функционирования иммунной системы пациентов различного возраста и, что особенно ценно, у новорожденных [1]. Однако обсуждение возможности добавления в национальную Программу скринирования новорожденных теста на ТКИН предлагается пока только на уровне иммунологического и педиатрического сообществ.

Целью данного исследования явилось научное обоснование необходимости включения в региональные программы массового обследования новорожденных детей исследований TREC и KREC для диагностики тяжелых комбинированных иммунодефицитов на основе проведения ретроспективного генетического анализа образцов крови больных детей, заболевания которых закончились летальным исходом на первом году жизни.

Пациенты и методы исследования

В настоящее ретроспективное исследование включены дети ($n = 43$, 19 мальчиков и 24 девочек

ки), умершие на первом году жизни в возрасте от 5 суток до 10 месяцев жизни за период 2012–2014 гг. на административной территории Свердловской области. В исследование включены дети с врожденными пороками развития ($n = 13$), острыми вирусными инфекциями ($n = 5$), другими инфекционными заболеваниями — пневмония, некротизирующий энтероколит, сепсис ($n = 17$) и иными заболеваниями ($n = 7$). Контрольную группу составили 52 клинически здоровых новорожденных ребенка (26 девочек и 26 мальчиков) в возрасте от 3 до 8 дней. Критерием отбора в данную группу служили отрицательные результаты неонатального скрининга по 16-ти скринируемым заболеваниям [3] и отсутствие данных об обращении родителей ребенка для получения консультации иммунолога или госпитализации ребенка в 2012–2015 гг. по поводу иммунозависимой патологии. В данной группе были определены референсные значения концентраций TREC и KREC для условно здоровых детей периода новорожденности.

Материалы и методы

Материалом для исследования послужили архивные образцы периферической крови на стандартных бумажных тест-бланках, взятые на 3–4 день жизни, для проведения стандартного неонатального скрининга. Экстракция ДНК из сухих пятен крови для методики количественной ПЦР в реальном времени проводилась с помощью коммерческого набора «ДНК-сорб-В» (Амплисенс, Россия). Геномную ДНК из сухих пятен крови и образцов цельной крови, используемую для молекулярно-генетических исследований с целью верификации диагноза «первичный иммунодефицит» (ПИД — ТКИН), выделяли автоматическим методом на станции MagNa Pure LC 2.0 (Roche, США).

Количественное определение маркеров наивных Т- и В-клеток было проведено с помощью мультиплексной тест-системы, созданной на базе Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (ИХБФМ СО РАН, Новосибирск) и Новосибирского государственного исследовательского университета (г. Новосибирск), совместно с ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 (ДГКБ № 9) им. Г.Н. Сперанского (Москва) [1].

Анализ делеции 22 хромосомы детей с подозрением на синдром Ди Джорджи проводили в лаборатории молекулярной диагностики на базе Клинико-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» (главный врач — Е.Б. Николаева, заведующий лабораторным отделом — В.В. Ворошнин) методом мультиплексной лигазной амплификации проб (MLPA). В работу был взят коммерческий набор SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland, The

Netherlands). Анализ образцов проводили согласно инструкции фирмы-производителя (MRC-Holland) на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (США). Полученные данные обрабатывали с помощью ПО Coffalyser (MRC-Holland).

Исследование генов *IL2RG* и *RAG1* проводили совместно с коллегами из лаборатории молекулярной биологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева (ФНКЦ ДГОИ им. Дм. Рогачева, Москва, директор — академик А.Г. Румянцев, заведующая лабораторией — Е.С. Райкина). Было выполнено прямое автоматическое секвенирование кодирующих областей генов, включая области экзон-интронных соединений. Амплификацию необходимых фрагментов геномной ДНК осуществляли методом ПЦР на программируемом термоциклере DNA Engine™ Dyad (Bio Rad, США). Секвенирование ПЦР-фрагментов с целью выявления редких мутаций проводилось согласно протоколу фирмы-производителя на генетическом анализаторе ABI PRISM 3130xl (Applied Biosystems, США).

Для статистической обработки полученных данных использовали пакет прикладных программ Statistica 6.0 и электронных таблиц Excel 2007.

Результаты и обсуждение

В зарубежных исследованиях используются различные подходы к оценке уровня содержания TREC и KREC: количество копий в расчете на микролитр крови, копий на условное количество ядросодержащих клеток, количество копий на реакцию [5, 7]. В нашей работе мы определяли количество копий TREC/KREC в объеме периферической крови, взятой для экстракции ДНК и в пересчете на количество ядросодержащих элементов в этом объеме — копий на 10^4 лейкоцитов. В результате количественной оценки содержания TREC и KREC в лимфоцитах периферической крови 52 клинически здоровых новорожденных детей было определено абсолютное количество копий данных маркеров лимфопоеза, которые в дальнейшем были приняты за референсные значения. В качестве «отсечки», разграничивающей понятия «норма — патология», мы рассматривали минимальный уровень TREC и KREC, обнаруженный в контрольной группе.

Сопоставление количества копий Т- и В-клеточных эксцизионных колец, полученных в образцах крови 43 детей, умерших на первом году жизни, показало, что у 27 пациентов (63,0%) оба показателя были выше порогового уровня контрольной группы. Это позволило отказаться от рабочей версии о наличии у данных детей неверифицированного первичного иммунодефицита. Однако у 16 детей — 8 мальчиков и 8 девочек — (37,0%) содержание TREC и (или) KREC оказалось значительно ниже минимального значения,

определенного для условно здоровых детей. При этом 4 ребенка имели сниженными сразу оба показателя, у 6 детей были низкие значения только TREC, еще у 6 — только KREC.

Мы провели анализ клинико-anamnestических данных детей со сниженными уровнями маркеров TREC и KREC, а в некоторых случаях, при доступности биологического материала в достаточном количестве, нами была выполнена молекулярно-генетическая диагностика первичных иммунодефицитов у этих пациентов.

На основании проведенного анализа выяснено, что дебют клинической манифестации заболеваний охватывал период от нескольких дней до 10 месяцев и более чем в 70% случаев (11/16) приходился на первые 3 месяца жизни.

Шесть детей из группы с низкими TREC и/или KREC имели множественные врожденные пороки развития, затрагивающие сердечно-сосудистую систему (5 случаев врожденных пороков сердца), внутренние органы (гастрошизис — 1 случай, пороки развития кишечника с формированием кишечной непроходимости — 1 случай, пороки развития почек и мочевыводящих путей — 2 случая), лицевой дисморфизм — один случай. Матери двоих детей имели диагноз ВИЧ-инфекции.

Спектр клинических проявлений представлен следующей инфекционной патологией: сепсис новорожденных — 5 случаев, пневмония — 3 случая, острая вирусная инфекция, осложненная — 3 случая, по 1 случаю острой респираторной инфекции и некротического энтероколита. В 2-х описываемых случаях инфекция приняла генерализованный характер, для 3-х детей состояние осложнилось разлитым гнойным перитонитом. У одного ребенка наблюдался выраженный геморрагический синдром.

Изменение состояния тимуса, по данным ультразвукового сканирования, отмечено у 12 (75,0%) детей из этой группы, в том числе гипоплазия тимуса — 8 случаев, микрокистозная гипопластическая дисплазия — 2 случая, акцидентальная трансформация (по данным постмортального исследования) — 2 случая.

Описанные клинические проявления заболевания, данные инструментально-диагностических и лабораторных исследований, а также результаты постмортальной верификации диагноза у детей, умерших на первом году жизни, позволяют предположить, что летальные исходы явились следствием тяжелой наследственной патологии иммунитета, не диагностированной прижизненно.

Кроме того, в пользу диагноза первичного иммунодефицита свидетельствуют результаты ретроспективной ДНК-диагностики для архивных образцов крови обследуемой группы детей. В настоящее время известно порядка 20-ти генов, ответственных за развитие ТКИН. Опираясь на работы зарубежных исследователей [12], мы провели молекулярную диагностику генети-

ческих дефектов в генах *IL2RG* (OMIM 300400) и *RAG1* (OMIM 175615), а также синдрома делеции 22q11.2 (OMIM 188400) — как самого частого микроделеционного синдрома, ассоциированного с иммунодефицитом.

На сегодняшний день обследованы образцы ДНК 5-ти детей с ВПС на наличие микроделеции 22-й хромосомы (del22q11.2). Молекулярно подтверждена del22q11.2 у одного пациента с клиническим диагнозом синдрома Ди Джорджи (TREC_{low}KREC_{low}).

Для исключения X-сцепленного варианта ТКИН для мальчиков со сниженными TREC/KREC был проведен молекулярно-генетический анализ гена *IL2RG*. Ни в одном образце ДНК не было выявлено нарушений нуклеотидной последовательности данного гена.

Молекулярно-генетический анализ еще одного из генов, ассоциированных с развитием ТКИН, гена активации рекомбиназы, *RAG1* — был выполнен для 8 детей со сниженными TREC/KREC. У одного ребенка (TREC_{low}) выявлена замена NM_000448.2: c.2571A>G, (Lys820Arg) в гетерозиготном состоянии, описанная в международной базе по мутациям HGMD (CM068079) как вероятно патогенная и ассоциированная с повышенным риском развития неходжкинских лимфом [6]. В 2-х образцах ДНК (KREC_{low}) в гетерозиготном состоянии обнаружена другая нуклеотидная замена NM_000448.2: c. 746 A> G (His249Arg), также описанная в международной базе по мутациям HGMD (CM122460) [8]. Один из детей (TREC_{low}KREC_{low}) являлся компаундом по этим изменениям: Lys820Arg / His249Arg. Согласно литературным данным, указанные варианты нуклеотидных замен встречаются у пациентов с ТКИН, в частности Оменн-подобным синдромом и фенотипом T-B⁺NK⁺/. Однако в последнее время большинство исследователей относят их к нейтральным полиморфизмам [9]. Исходя из этого, мы не можем с большой вероятностью утверждать, что данные замены в ДНК явились причиной летального исхода пациента. Однако тот факт, что подобный генотип был отмечен в научных статьях у пациентов с клинически подтвержденным ТКИН, а также анализ клинико-anamnestических данных описываемого пациента (гипотрофия, множественные эпизоды обструктивного бронхита в течение первых 6-ти месяцев, кардиомиопатия, язвенно-некротический ларингит, трансформация тимуса III фазы и острая двусторонняя прогрессирующая пневмония, приведшая к летальному исходу в 10 месяцев), говорит скорее в пользу нашей гипотезы о врожденном дефекте иммунной системы ребенка как первопричины нарушения ее функционирования на первом году жизни.

Еще у одного пациента из группы сниженных TREC и KREC мы обнаружили в гене *RAG1* не описанную ранее нуклеотидную замену NM_000448.2: c. 1315C>G (Leu439Val) в гетерозиготном состоянии. Теоретические расчеты

in silico (PolyPhen2.0) дают основания рассматривать данный вариант замены как вероятно патогенный. Ввиду ограниченного количества доступного биоматериала ребенка и отсутствия выхода на взаимодействие с родителями, нам не удалось обнаружить вторую мутацию. Тем не менее, совокупность клинических, гематологических и косвенно-молекулярно-генетических данных не отвергают диагноз ТКИН также и в рассматриваемом случае.

Для остальных пациентов предполагать определенные виды ТКИН, основываясь на данных о нуклеотидных заменах в одном гене, невозможно. Для дифференциальной диагностики различных вариантов первичных иммунодефицитов в нашем случае оптимальным вариантом послужили бы повторные исследования ДНК на панель первичных иммунодефицитов методом секвенирования следующего поколения (next-generation sequencing, NGS).

Заключение

Проведенное ретроспективное исследование TREC и KREC в образцах крови детей раннего возраста, умерших от различных причин, позволило предположить в ряде случаев наследственную патологию иммунной системы. В одном из них подтвержден диагноз первичного иммунодефицита — синдром del22q11.2, еще в пяти случаях обнаружены изменения в нуклеотидной последовательности гена *RAG1*, ответственного за активацию рекомбиназ во время V(D)J-реаранжировки T- и B-клеточных рецепторов, причем 2 варианта замен описаны в международной базе данных HGMD как ассоциированные с фенотипом дефектного функционирования иммунной системы, и один вариант замены яв-

ляется уникальным, ранее не описанным. Подобные находки дают основание утверждать, что причиной летального исхода данных детей могла быть тяжелая комбинированная иммунная недостаточность (ТКИН).

Таким образом, количественная оценка TREC и KREC в сухом пятне крови, взятого для неонатального скрининга может иметь диагностическую ценность в анализе некоторых случаев младенческой смертности, регистрация которых в настоящее время проводится по фенотипическим проявлениям заболеваний, снижая тем самым статистическую величину распространения патологии (ПИД). Кроме того, ретроспективно установленный диагноз ТКИН является показанием для направления пострадавшей семьи на медико-генетическое консультирование.

Внедрение современных генетических технологий, в частности программы скрининга на тяжелый комбинированный иммунодефицит, в практику массового обследования новорожденных способствует ранней диагностике врожденных ошибок иммунитета и тем самым может значительно улучшить качество и продолжительность жизни детей с наследственными заболеваниями, относящимися к категории первичных иммунодефицитов.

Благодарности

Авторы выражают искреннюю благодарность заведующей отделением иммунологии ФНКЦ ДГОИ им Дмитрия Рогачева, д.м.н., профессору Щербине Анне Юрьевне за проявленную заинтересованность к данной работе и активное содействие в проведении ретроспективной молекулярной диагностики ПИД.

Список литературы / References

1. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филиппенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunsky I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex pcr for the quantitative determination of TREC'S and KREC'S in whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 5, no. 17, pp. 467-478. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-5-467-478>
2. Краснопольская К.Д. Наследственные болезни обмена веществ. Справочное пособие для врачей. М.: ООО «Центр социальной адаптации и реабилитации детей «Фохат», 2005. 364 с. [Krasnopol'skaya K.D. Hereditary diseases of a metabolism. The handbook for physicians]. Moscow: ROO Tsentr sotsial'noi adaptatsii i reabilitatsii detei "Fokhat" Publ., 2005. 364 p.
3. Приказ МЗ Свердловской области от 02.03.2012 г. № 166-п «О совершенствовании массового обследования новорожденных детей на наследственные заболевания на территории Свердловской области». URL: <http://ekb4.info/Yekaterinburg8/prikaz16.htm> (дата обращения: 28.04.2015). [The order of Health Ministry of Sverdlovsk region of 02.03.2012 no. 166-p. About perfecting of mass inspection of newborn children on heritable diseases in the territory of Sverdlovsk region. <http://ekb4.info/Yekaterinburg8/prikaz16.htm>, accessed on 28.04.2015. (In Russ.)]
4. Chan K., Puck J.M. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2005, Vol. 115, pp. 391-398.
5. Gerstel-Thompson J.L., Wilkey J.F., Baptiste J.C., Navas J.C., Pai S.-Yu., Pass K.A., Eaton R.B., Comeau A.M. High-throughput multiplexed T-cell-receptor excision circle quantitative PCR assay with internal controls for

detection of severe combined immunodeficiency in population-based newborn screening. *Clinical Chemistry*, 2010, Vol. 56, no. 9, pp. 1466-1474.

6. Hill D.A., Wang S.S., Cerhan J.R., Davis S., Cozen W., Severson R.K., Hartge P., Wacholder S., Yeager M., Chanock S.J., Rothman N. Risk of non-Hodgkin lymphoma (NHL) in relation to germline variation in DNA repair and related genes. *Blood*, 2006, Vol. 108, no. 9, pp. 3161-3167

7. Janik K.D., Lindau-Shepard B., Comeau A.M., Pass K.A. A multiplex immunoassay using the Guthrie specimen to detect T-cell deficiencies including severe combined immunodeficiency disease. *Clinical Chemistry*, 2010, Vol. 56, no. 9, pp. 1460-1465.

8. Kutukculer N., Gulez N., Karaca N.E., Aksu G., Berdeli A. Novel mutations and diverse clinical phenotypes in recombination-activating gene 1 deficiency. *Ital. J. Pediatr.*, 2012, Vol. 38, p. 8.

9. Notarangelo L.D., Fischer A., Geha R.S., Casanova J.L., Chapel H., Conley M.E., Rundles C.C., Etzioni A., Hammarstrom L., Nonoyama S., Ochs H.D., Puck J., Roifman C., Seger R., Wedgwood J. Primary immunodeficiencies: 2009 update. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 124, pp. 1161-1178.

10. Olbrich P., de Felipe B., Delgado-Pecellin C., Robero R., Rojas P., Aguayo J. A first pilot study on the neonatal screening of primary immunodeficiencies in Spain: TRECs and KRECs identify severe T- and B-cell lymphopenia. *An Pediatr (Barc.)*, 2014, Vol. 81, no. 5, pp. 310-317

11. Serana F., Chiarini M., Zanotti C., Sottini A., Bertoli D., Bosio A., Caima L., Imberti L. Use of V(D)J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *Journal of Translational Medicine*, 2013, Vol. 11, p. 119.

12. van der Spek J., Groenwold R.H.H., van der Burg M., van Montfrans J.M. TREC based newborn screening for severe combined immunodeficiency disease: a systematic review. *J. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 35, pp. 416-430.

13. van Zelm M. C., van der Burg M., Langerak A.W., van Dongen J.J.M. PID comes full circle: applications of V(D)J recombination excision circles in research, diagnostics and newborn screening of primary immunodeficiency disorders. *Frontiers in Immunology*, 2011, Vol. 2, no. 12, pp. 1-8.

14. Verbsky J., Thakar M., Rantes J. The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2012, Vol. 129, no. 3, pp. 622-627

Авторы:

Дерябина С.С. — заведующая лабораторией молекулярной диагностики ГБУЗ СО «Клинико-диагностический центр «Охрана здоровья матери и ребенка»; младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; младший научный сотрудник кафедры иммунохимии ХТИ ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина; врач аллерголог-иммунолог научного отдела ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Власова Е.В. — к.м.н., заведующая отделением клинической иммунологии ГБУЗ СО «Областная детская клиническая больница № 1», г. Екатеринбург, Россия

Лаврина С.Г. — врач клинической лабораторной диагностики лаборатории молекулярной биологии ФГБУ «Федеральный научный клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева», Москва, Россия

Шершнева В.Н. — к.ф.-м.н., научный сотрудник ФГБУН «Институт промышленной экологии» Уральского отделения РАН; доцент кафедры вычислительной техники, ГОАУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

Deryabina S.S., Head, Laboratory of Molecular Diagnostics, The Medical Centre "Healthcare of Mother and Child"; Junior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Medical Sciences; Junior Research Associate, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Tuzankina I.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Medical Sciences; Leading Research Associate, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University; Clinical Allergologist/Immunologist, Research Department, Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Vlasova E.V., PhD (Medicine), Head, Department of Immunology, Sverdlovsk Regional Children Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Lavrina S.G., Laboratory Clinician, Laboratory of Molecular Biology, D. Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Shershnev V.N., PhD (Physics & Mathematics), Research Associate, Institute of Industrial Ecology; Assistant Professor of Computer Engineering Department, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 14.07.2016
Принята к печати 27.08.2016

Received 14.07.2016
Accepted 27.08.2016

ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ОНКОУРОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ В ДИНАМИКЕ ЗАБОЛЕВАНИЯ

Куртасова Л.М., Зуков Р.А., Семенов Э.В.

ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Резюме. Цель исследования — изучение показателей люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у больных почечно-клеточным раком и раком мочевого пузыря в период до хирургического лечения и через 10 суток после оперативного вмешательства.

Проведены наблюдения за больными почечно-клеточным раком и раком мочевого пузыря в период до ($n = 60$) и через 10 суток после операции ($n = 46$) в возрасте 45-55 лет. Контрольную группу составили 56 здоровых доноров крови. Люминол- и люцигенин-зависимую хемилюминесценцию нейтрофилов крови оценивали методом De Sole et al. (1983).

У больных почечно-клеточным раком и раком мочевого пузыря в нейтрофилах крови выявили изменение системы продукции активных форм кислорода в динамике заболевания. Обнаруженные изменения зависят от локализации опухолевого процесса. У больных почечно-клеточным раком изменения преимущественно затрагивают продукцию первичных активных форм кислорода, у больных раком мочевого пузыря — начальные стадии окислительного метаболизма и вторичные активные формы кислорода. Восстановление компенсаторных метаболических возможностей нейтрофилов крови в послеоперационном периоде быстрее происходит у больных раком мочевого пузыря.

Полученные данные уточняют особенности хемилюминесцентного ответа нейтрофилов периферической крови у онкоурологических больных, которые необходимо, вероятно, использовать при разработке иммунореабилитационных программ у данной категории больных в послеоперационном периоде.

Ключевые слова: хемилюминесценция, нейтрофилы, активные формы кислорода, рак почки, рак мочевого пузыря, онкоурология

FEATURES NEUTROPHIL CHEMILUMINESCENCE OF PERIPHERAL BLOOD IN ONCOUROLOGICAL PATIENTS IN THE DISEASE DYNAMICS

Kurtasova L.M., Zukov R.A., Semenov E.V.

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

Abstract. Study Objectives — the study of indicators and luminol- lucigenin-dependent chemiluminescence of peripheral blood neutrophils in patients with renal cell carcinoma and bladder cancer prior to the surgery and 10 days after surgery.

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Л.М. Куртасова, Р.А. Зуков, Э.В. Семенов «Особенности хемилюминесценции нейтрофилов периферической крови у онкоурологических больных в динамике заболевания» // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 589-594.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-589-594

© Куртасова Л.М. и соавт., 2016

For citation:

L.M. Kurtasova, R.A. Zukov, E.V. Semenov "Features neutrophil chemiluminescence of peripheral blood in oncurological patients in the disease dynamics", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 589-594.
doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-589-594

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2016-6-589-594>

Held for observation of renal cell carcinoma and bladder cancer patients prior to the (n = 60) and 10 days after surgery (n = 46), aged 45-55 years. The control group consisted of 56 healthy blood donors. Luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence of blood neutrophils estimated De Sole et al. (1983).

In patients with renal cell carcinoma and bladder cancer in blood neutrophils showed a change of the system of production of reactive oxygen species in the course of the disease. The observed changes depend on the localization of the tumor process. In patients with renal cell carcinoma changes mainly affect the primary production of reactive oxygen species in patients with bladder cancer early stages of oxidative metabolism and secondary reactive oxygen species. Restoring compensatory metabolic capacity of blood neutrophils in the postoperative period will occur in patients with bladder cancer.

The findings clarify the features of the chemiluminescence response of peripheral blood neutrophils from oncurological patients that should probably be used in the development of immune rehabilitation programs in this category of patients in the postoperative period.

Keywords: chemiluminescence, neutrophils, reactive oxygen species, kidney cancer, bladder cancer, oncurology

Введение

Онкоурологические заболевания составляют 23,6% всех злокачественных новообразований у мужчин в Российской Федерации. К наиболее агрессивным опухолям с непредсказуемым клиническим течением относят почечно-клеточный рак (ПКР), входящий в тройку лидеров в структуре онкологической заболеваемости у мужчин в возрасте 30-59 лет. Рак мочевого пузыря (РМП) характеризуется высокой частотой рецидивов и значительно влияет на качество жизни. Кроме того, при инвазивном характере роста и метастатическом поражении лимфатических узлов показатели 5-летней выживаемости даже при выполнении радикального хирургического лечения не превышают 13,9-15,1% [1, 2, 3].

В настоящее время к эффекторным клеткам системы естественной противоопухолевой резистентности наряду с макрофагами и естественными киллерами относят нейтрофильные гранулоциты, способные оказывать выраженное цитотоксическое действие на опухолевые клетки [4, 8].

«Респираторный взрыв» относится к серии метаболических процессов, результатом которых является продукция активных форм кислорода (АФК), обладающих бактерицидным действием и обеспечивающих цитотоксический эффект в отношении опухолевых клеток. Первичным метаболитом активированного кислорода является супероксидный анион-радикал (O_2^-), с которого берет начало весь каскад (АФК). Как первичные, так и вторичные оксиданты обладают мощным энергетическим потенциалом, а их взаимопревращения создают динамический спектр молекул, которые обеспечивают антитело-зависимую цитотоксичность нейтрофильных гранулоцитов [3, 6, 9, 10, 11]. При этом нейтрофилы обладают наибольшей из всех клеток организма способностью генерировать АФК [4].

В связи с вышеизложенным целью исследования явилось изучение показателей люминол- и люцигенин-зависимой хемилюминесценции

(ХЛ) нейтрофилов периферической крови у пациентов ПКР и РМП в период до хирургического лечения и через 10 суток после оперативного вмешательства.

Материалы и методы

Проведено открытое клиническое проспективное исследование. Критерии включения в исследование: возраст пациентов 45-55 лет; гистологически верифицированный почечно-клеточный рак либо рак мочевого пузыря; III стадия заболевания (T3N0M0); хирургическое лечение в объеме радикальной нефрэктомии или радикальной цистэктомии; информированное согласие на участие в исследовании. Критерии исключения: наличие злокачественной опухоли другой локализации; предшествующая химио- или лучевая терапия; тяжелая сопутствующая патология, отказ пациента от участия в исследовании.

Исследование проведено на базе урологического отделения Красноярского краевого клинического онкологического диспансера в динамике до оперативного вмешательства (n = 60) и через 10 суток после хирургического лечения (n = 46). Контрольную группу составили 56 здоровых доноров крови. Исследование одобрено Локальным этическим комитетом КрасГМУ (протокол № 60/2015).

Люминол- и люцигенин-зависимую ХЛ нейтрофилов периферической крови оценивали методом De Sole et al. [7] на биохемилюминесцентном анализаторе CL 3606M (Россия). Определяли следующие параметры: время выхода на максимум (T_{max}), максимальное значение свечения (I_{max}) и площадь под ХЛ кривой (S). В качестве индуктора «дыхательного взрыва» использовали опсонизированный зимозан в концентрации 2 мг/мл («Sigma» США). Усиление ХЛ индуцированной зимозаном относительно спонтанной ХЛ оценивали при помощи соотношения $S_{\text{зимозан}}/S_{\text{спонтанная}}$ и определяли как индекс активации.

Статистический анализ полученных данных выполнен с использованием пакета прикладных

программ STATISTICA v. 8.0 (StatSoft, Inc., США). Оценку статистической значимости межгрупповых различий устанавливали с использованием U-критерия критерия Манна–Уитни. Результаты исследования количественных параметров в группах сравнения представлены в виде медианы (Me) и интерквартильным размахом [$Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$]. За критический уровень значимости при проверке статистических гипотез при исследовании принят $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Изучение показателей люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов периферической крови у больных ПКР в период до хирургического лечения установило статистически значимое увеличение времени выхода на максимум свечения и тенденцию к увеличению площади спонтанной ХЛ-кривой по сравнению с показателями контрольной группы. При индукции ХЛ-реакции опсонизированным зимозаном увеличивается время реагирования на стимул, отмечается выраженная тенденция к повышению максимального уровня «дыхательной вспышки» и к увеличению площади под ХЛ-кривой относительно параметров группы контроля (табл. 1).

В период через 10 суток после хирургического лечения у больных ПКР сохраняется увеличение времени выхода на максимум спонтанной и индуцированной зимозаном люминол-зависимой ХЛ, а также наблюдается статистически значимое увеличение площади индуцированной ХЛ-кривой по сравнению с контрольными величинами. Кроме того, повышается величина индекса активации по сравнению с контролем и средних значений, зарегистрированных у больных ПКР в период до оперативного вмешательства (табл. 1).

Оценка параметров люцигенин-зависимой ХЛ нейтрофилов периферической крови у больных ПКР в период до хирургического лечения обнаружила увеличение площади под спонтанной ХЛ-кривой относительно контрольных параметров. Индукция ХЛ-ответа нейтрофилов крови опсонизированным зимозаном сокращала время реагирования на стимул, увеличивала интенсивность «дыхательной вспышки» и площадь ХЛ-кривой по сравнению с показателями группы сравнения. Необходимо отметить, что в данный период наблюдения у больных ПКР отмечается выраженная тенденция к понижению индекса активации относительно контроля (табл. 1). В период через 10 суток после оперативного вмешательства отмечается тенденция к ускорению времени выхода на пик спонтанной ХЛ-кривой по сравнению с контрольными параметрами, а также увеличение площади спонтанной

ХЛ-кривой относительно показателей группы контроля и уменьшение по сравнению со значениями, зарегистрированными в период до хирургического лечения. После индукции опсонизированным зимозаном была отмечена тенденция к увеличению времени реагирования на стимул по сравнению с показателями, зарегистрированными в дооперационный период. В то же время наблюдали статистически значимое повышение максимального уровня «дыхательной вспышки», выраженную тенденцию к увеличению площади индуцированной ХЛ-кривой и сохранению тенденции к понижению индекса активации относительно контрольных величин (табл. 1).

Исследование параметров люминол-зависимой ХЛ нейтрофилов у больных РМП в период до оперативного вмешательства выявило увеличение времени выхода на максимум свечения спонтанной и индуцированной опсонизированным зимозаном ХЛ, повышение интенсивности свечения и увеличение площади индуцированной ХЛ-кривой по сравнению с показателями контрольной группы. Кроме того, установлено статистически значимое увеличение величины индекса активации по сравнению с соответствующими показателями контрольной группы (табл. 2). В период через 10 суток после хирургического лечения отмечалось сохранение замедленного выхода на максимум интенсивности свечения спонтанной ХЛ-кривой, повышение максимума «дыхательной вспышки» и увеличение площади спонтанной и индуцированной ХЛ относительно соответствующих параметров контроля (табл. 2).

Анализ данных люцигенин-зависимого ХЛ-ответа нейтрофилов крови у больных РМП в период до хирургического лечения установил увеличение величины максимума «дыхательной вспышки» и площади спонтанной хемилюминесценции относительно аналогичных показателей группы контроля. После стимуляции нейтрофилов крови опсонизированным зимозаном обнаружено статистически значимое повышение интенсивности свечения и увеличения площади под индуцированной ХЛ-кривой по сравнению с контрольными показателями (табл. 2).

В период через 10 суток после хирургического лечения сохраняется увеличение интенсивности и площади как спонтанной, так и стимулированной зимозаном хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных РМП относительно соответствующих показателей группы контроля (табл. 2).

Таким образом, анализ полученных данных показал изменение кинетики и интенсивности ХЛ-ответа, а также компенсаторных метаболических возможностей нейтрофилов периферической крови у больных ПКР и РМП в динамике за-

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ ПОЧЕЧНО-КЛЕТОЧНЫМ РАКОМ, Ме [$Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$]

Показатель	Контрольная группа (n = 56)		Больные до операции (n = 60)		Больные после операции (n = 46)	
	Люминол- зависимая ХЛ	Люцигенин- зависимая ХЛ	Люминол- зависимая ХЛ	Люцигенин- зависимая ХЛ	Люминол- зависимая ХЛ	Люцигенин- зависимая ХЛ
Спонтанная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	505,50 [208,50- 1502,50]	1989,00 [1624,00- 2440,00]	1517,00 [634,00- 2172,00] $p_1 < 0,01$	2033,00 [1334,00- 2362,00]	1642,00 [1109,00- 2240,00] $p_1 < 0,01$	1442,00 [1033,00- 2177,00] $0,1 > p_2 > 0,05$
Imax, о.е. * 10^3	6,67 [3,04-18,70]	1,22 [0,79-8,99]	8,62 [3,07-20,43]	7,51 [4,08-23,72]	8,05 [5,46-17,25]	5,43 [1,38-17,41]
S ₁ , о.е. * 10^5	2,06 [1,23-4,60]	0,57 [0,36-1,93]	2,81 [0,99-9,54] $0,1 > p_2 > 0,05$	2,88 [0,70-8,33] $p_2 < 0,001$	2,61 [1,22-9,31]	1,56 [0,31-3,21] $p_2 < 0,01$ $p_4 < 0,05$
Индукцированная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1270,00 [862,00- 1779,00]	1799,00 [719,00- 2525,00]	1624,00 [1177,00- 2121,00] $p_1 < 0,01$	941,00 [215,00- 1693,00] $p_2 < 0,05$	1845,00 [1570,00- 2258,00] $p_1 < 0,01$	1445,00 [531,00- 1913,00] $0,1 > p_4 > 0,05$
Imax, о.е. * 10^3	10,54 [4,98-41,70]	1,94 [1,10-6,53]	17,55 [5,84-48,63] $0,1 > p_1 > 0,05$	7,11 [4,30-21,89] $p_2 < 0,05$	13,16 [6,18-32,11]	6,94 [1,87-37,52] $p_2 < 0,01$
S ₂ , о.е. * 10^5	3,78 [1,53-9,40]	0,78 [0,53-3,21]	4,48 [1,92-20,20] $0,1 > p_1 > 0,05$	3,30 [1,12-11,9] $p_2 < 0,01$	5,01 [1,95-17,80] $p_1 < 0,01$	1,87 [0,34-11,40] $0,1 > p_2 > 0,05$
S ₂ /S ₁	1,87 [1,52-3,00]	1,65 [1,05-1,75]	1,83 [0,98-2,9]	1,25 [0,96-1,53] $0,1 > p_2 > 0,05$	2,6 [1,59-2,64] $p_1 < 0,05$ $P_3 < 0,05$	1,35 [1,21-1,76] $0,1 > p_2 > 0,05$

Примечание. p – статистически значимые различия; ХЛ – хемилюминесценция.

болевания. Безусловно, выявленные изменения кислородозависимого метаболизма в нейтрофилах крови могут способствовать нарушению реализации цитопатического эффекта клетки.

При этом первичная локализация опухолевого процесса сопровождается различным уровнем изменений в системе продукции АФК нейтрофилами крови у наблюдаемых нами пациентов. Так, нейтрофилы крови у больных ПКР характеризуются высоким базовым уровнем продукции первичных АФК без адекватного повышения способности нейтрофилов к усилению выработки первичных АФК в ответ на стимуляцию *in vitro*, о чем свидетельствует выраженная тенденция к уменьшению величины индекса активации клеток в ХЛ-тесте с люцигенином. В это же время у больных РМП до оперативного вмешательства наряду с повышением интенсивности про-

дукции супероксидных радикалов в нейтрофилах крови отмечается активация биохимических процессов, ответственных за продукцию вторичных АФК.

После хирургического лечения у больных ПКР наблюдается тенденция к нормализации уровня спонтанной продукции первичных АФК. Однако полного восстановления компенсаторных метаболических возможностей ферментных систем, ответственных за продукцию первичных АФК не происходит, поскольку сохраняется выраженная тенденция к снижению величины индекса активации нейтрофилов при люцигенин-зависимой ХЛ. Нейтрофилы крови у больных РМП в этот период наблюдения сохраняют высокую метаболическую активность АФК продуцирующих систем клетки как в начале цепи преобразования АФК, так и на этапе суммарного эффекта.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ НЕЙТРОФИЛОВ КРОВИ У БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЧЕВОГО ПУЗЫРЯ, Me [Q_{0,25} - Q_{0,75}]

Показатель	Контрольная группа (n = 56)		Больные до операции (n = 60)		Больные после операции (n = 46)	
	Люминол- зависимая ХЛ	Люцигенин- зависимая ХЛ	Люминол- зависимая ХЛ	Люцигенин- зависимая ХЛ	Люминол- зависимая ХЛ	Люцигенин- зависимая ХЛ
Спонтанная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	505,50 [208,50- 1502,50]	1989,00 [1624,00- 2440,00]	1692,00 [1117,00- 2110,00]	2171,00 [1872,00- 2472,00]	1439,00 [673,50- 2027,00] p ₁ < 0,05	2142,00 [1318,00- 2206,00]
Imax, о.е. * 10 ³	6,67 [3,04-18,70]	1,22 [0,79-8,99]	7,08 [2,99-17,13]	9,12 [2,36-14,56] p ₂ < 0,01	14,92 [8,30-31,04] p ₁ < 0,05	14,50 [4,37-33,37] p ₂ < 0,01
S ₁ , о.е. * 10 ⁵	2,06 [1,23-4,60]	0,57 [0,36-1,93]	2,18 [0,85-12,45]	2,51 [0,51-6,31] p ₂ < 0,05	5,03 [1,58-11,89] p ₁ < 0,05	4,18 [0,66-9,93] p ₂ < 0,01
Индукцированная хемилюминесценция						
Tmax, сек.	1270,00 [862,00- 1779,00]	1799,00 [719,00- 2525,00]	1925,00 [11431,00- 2079,00]	1540,00 [824,00- 2138,00]	1663,50 [1284,50- 1793,50]	1871,50 [1378,00- 2111,00]
Imax, о.е. * 10 ³	10,54 [4,98-41,70]	1,94 [1,10-6,53]	24,15 [17,11-42,77] p ₁ < 0,05	10,76 [5,50-22,81] p ₂ < 0,01	23,76 [10,45-61,06] p ₁ < 0,05	23,48 [5,34-30,86] p ₂ < 0,05
S ₂ , о.е. * 10 ⁵	3,78 [1,53-9,40]	0,78 [0,53-3,21]	8,25 [3,31-18,80] p ₁ < 0,05	3,30 [1,40-7,00] p ₂ < 0,05	5,22 [1,75-49,88] p ₁ < 0,05	4,27 [1,27-19,70] p ₂ < 0,05
S ₂ /S ₁	1,87 [1,52-3,00]	1,65 [1,05-1,75]	3,14 [2,24-4,59] p ₁ < 0,05	1,98 [1,37-2,23]	1,92 [1,22-3,03]	1,72 [0,97-1,92]

Примечание. p – статистически значимые различия; ХЛ – хемилюминесценция.

При этом высокая продукция вторичных АФК может привести к перекисному окислению липидов клеточных мембран и отрицательно отразиться на функциональном состоянии клетки.

Заключение

Результаты проведенного исследования выявили изменения показателей ХЛ нейтрофилов периферической крови у больных ПКР и РМП в динамике заболевания. Особенности ХЛ-ответа нейтрофилов крови зависели от локализации опухолевого процесса. Изменения кислородно-

го метаболизма нейтрофилов крови у больных ПКР преимущественно затрагивают продукцию супероксидных радикалов, у больных РМП наблюдаются изменения не только на начальном этапе окислительных реакций, но и на уровне продукции вторичных АФК. В то же время компенсаторные метаболические возможности нейтрофилов крови в послеоперационном периоде быстрее восстанавливаются в группе больных РМП. Полученные нами данные, вероятно, необходимо учитывать при разработке иммунореабилитационных программ в послеоперационном периоде у онкоурологических пациентов.

Список литературы / References

1. Комяков Б.К., Гулиев Б.Г., Сергеев А.В., Фадеев В.А., Ульянов А.Ю., Савашинский Я.С., Касьяненко С.С. Выживаемость больных раком мочевого пузыря после радикальной цистэктомии // Онкоурология, 2016. № 1. С. 29-36. [Komyakov B.K., Guliev B.G., Sergeev A.V., Fadeev V.A., Ulyanov A.Yu., Savashinskiy Ya.S., Kasyanenko S.S. The survival rate of patients with bladder cancer after radical cystectomy. *Onkourologiya = Oncourology*, 2016, Vol. 12, no. 1, pp. 29-36. (In Russ.)]
2. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность) / Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с. [Malignancies in Russia in 2015 (morbidity and mortality) / Eds. Caprin A.D.,

Starinskiy V.V., Petrova G.V.]. Moscow: MNIOI n.a. P.A. Herzen – branch «NMIRTS» Russian Ministry of Health, 2017. 250 p.

3. Зуков Р.А., Дыхно Ю.А., Модестов А.А., Шкапова Е.А. Почечно-клеточный рак. Новосибирск: Наука, 2015. 244 с. [Zukov R.A., Dukhno Yu.A., Modestov A.A., Shkapova E.A. Renal cell carcinoma]. Novosibirsk: Science, 2015. 244 p.

4. Нестерова И.В., Колесникова Н.В., Чудилова Г. А., Ломтатидзе Л.В., Ковалева С.В., Евглевский А.А. Нейтрофильные гранулоциты: новый взгляд на «старых игроков» // Иммунология, 2015. № 4. С. 257-265. [Nesterova I.V., Kolesnikova N.V., Chudilova G.A., Lomtaticidze L.V., Kovaleva S.V., Evglevskiy A.A. Neutrophil granulocytes: a new look at the «old players». *Immunologiya = Immunology*, 2015, no. 4, pp. 257-265. (In Russ.)]

5. Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А. Показатели люцигенин- и люминолзависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови у больных раком почки // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2010. Т. 149, № 2. С. 201-203. [Shkapova E.A., Kurtasova L.M., Savchenko A.A. Indicators lyutsigenin- and luminol chemiluminescence of blood neutrophils in patients with kidney cancer. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2010, Vol. 149, no. 2, pp. 201-203. (In Russ.)]

6. Benbarek H., Ayad A., Deby-Dupont G., Boukraa L., Serteyn D. Modulatory effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs on the luminol and lucigenin amplified chemiluminescence of equine neutrophils. *Vet. Res. Commun.*, 2012, Vol. 36, no. 1, pp. 29-33.

7. de Sole P., Lippa S., Lixxarru G. Whole blood chemiluminescence: a new technical approach to access oxygen-dependent microbial activity of granulocytes. *J. Clin. Lab. Autom.*, 1983, Vol. 3, pp. 391-400.

8. Di Carbo E., Forni G., Musiani P. Neutrophils in the antitumoral immune response. *Chem. Immunol. Allergy*, 2003, Vol. 83, pp. 182-286.

9. Kubota K., Saiwai H., Kumamaru H., Maeda T., Ohkawa Y., Aratani Y., Nagano T., Iwamoto Y., Okada S. Myeloperoxidase exacerbates secondary injury by generating highly reactive oxygen species and mediating neutrophil recruitment in experimental spinal cord injury. *Spine*, 2012, Vol. 37, no. 16, pp. 1363-1369.

10. Marcoux J., Man P., Petit-Haertlein I., Vives C., Forest E., Fieschi F. P47phox molecular activation for assembly of the neutrophil NADPH oxidase complex. *J. Biol. Chem.*, 2010, Vol. 285, no. 37, pp. 28980-28990.

11. Prokopowicz Z., Marcinkiewicz J., Katz D.R., Chain B.M. Neutrophil myeloperoxidase: soldier and statesman. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz)*, 2010, Vol. 60, no. 2, pp. 43-54.

Авторы:

Куртасова Л.М. — д.м.н., профессор, кафедра клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Зуков Р.А. — д.м.н., доцент, заведующий кафедрой онкологии и лучевой терапии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Семенов Э.В. — аспирант кафедры онкологии и лучевой терапии с курсом ПО ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Authors:

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

Zukov R.A., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Oncology and Radiotherapy with the Course of Postgraduate Education, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Semenov E.V., Postgraduate Research Fellow, Department of Oncology and Radiotherapy with the Course of Postgraduate Education, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 08.10.2016
Принята к печати 12.10.2016

Received 08.10.2016
Accepted 12.10.2016

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 содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx., rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

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

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Альварес С.	545	Зварцев Р.В.	569	Смирнова С.В.	563
Астраханцева И.В.	505	Зуков Р.А.	589	Соколов А.В.	555
Атретханы К.-С.	569	Карасева А.Б.	555	Соколов Д.И.	521
Баландин С.В.	575	Кокряков В.Н.	575	Старикова Э.А.	555
Болосов И.А.	575	Коленчукова О.А.	563	Степанова О.И.	521
Будкова А.И.	537	Крамская Т.А.	545	Суворов А.Н.	545, 555
Бурова Л.А.	555	Круглов А.А.	569	Суркова Е.А.	537
Василенко Е.А.	505	Кудрявцев И.В.	575	Тиллиб С.В.	505
Васильев В.Б.	555	Куртасова Л.М.	589	Титова О.Н.	537
Виллена Д.	545	Лаврина С.Г.	583	Ткаченко О.Ю.	537
Власова Е.В.	583	Лайно Д.	545	Тотолян Арег А.	537
Гоголева В.С.	569	Лапин С.В.	537	Тузанкина И.А.	583
Горшкова Е.А.	569	Лаптева А.М.	563	Умнякова Е.С.	575
Горшкова Е.Н.	505	Леонтьева Г.Ф.	545	Филатенкова Т.А.	575
Грабовская К.Б.	545	Недоспасов С.А.	569	Филимонова В.Ю.	545
Грудинина Н.А.	575	Овчинникова Т.В.	575	Фрейдлин И.С.	555
Гусева В.И.	537	Орлов Д.С.	575	Цветкова Е.В.	575
Даниленко В.Н.	545	Пантелеев П.В.	575	Шамова О.В.	575
Дерябина С.С.	583	Первакова М.Ю.	537	Шершнев В.Н.	583
Друцкая М.С.	569	Сельков С.А.	521	Эмануэль В.Л.	537
Жданова А.С.	569	Семенов Э.В.	589		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

адьюванты	546	первичные иммунодефициты (ПИД).....	583
активные формы кислорода	589	перенос антител к коллагену	569
альфа-1-антитрипсин	537	плацента	521
антимикробные пептиды	576	пневмококковая инфекция	546
аргинин	555	полипозный риносинусит.....	563
аргининдеиминаза	555	пробиотики.....	546
астматическая триада	563	пролиферация	555
аципенсин 1	576	проникающие в клетки пептиды	576
беременность.....	521	рак мочевого пузыря	589
биоинженерные препараты	505	рак почки	589
биспецифические антитела	505	рекомбинантные белки.....	546
верблюжьи антитела.....	505	ретроспективная диагностика	583
воспаление.....	537	трофобласт.....	521
дефицит альфа-1-антитрипсина.....	537	тяжелая комбинированная иммунная	
децидуальная оболочка	521	недостаточность (ТКИН)	583
иммунитет	563	фенотип альфа-1-антитрипсина.....	537
лактобациллы	546	хемилюминесценция	589
лимфоциты	521	цитокин	537
массовое обследование новорожденных.....	583	экспериментальный артрит	569
микробиоценоз.....	563	эндотелиальные клетки	555
мукозальные вакцины.....	546	IL-6	569
наноантитела	505	KREC	583
нейтрализующие антитела	569	<i>S. pyogenes</i>	555
нейтрофилы.....	589	TNF.....	569
однодоменные антитела.....	505	TREC	583
онкоурология	589	VHH	505

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА 6 В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АРТРИТЕ, ВЫЗВАННОМ ПЕРЕНОСОМ АРТРИТОГЕННЫХ АНТИТЕЛ» (АВТОРЫ: ДРУЦКАЯ М.С., ГОРШКОВА Е.А., ЖДАНОВА А.С., АТРЕТХАНЫ К.-С., ГОГОЛЕВА В.С., ЗВАРЦЕВ Р.В., КРУГЛОВ А.А., НЕДОСПАСОВ С.А. (с. 569-574)

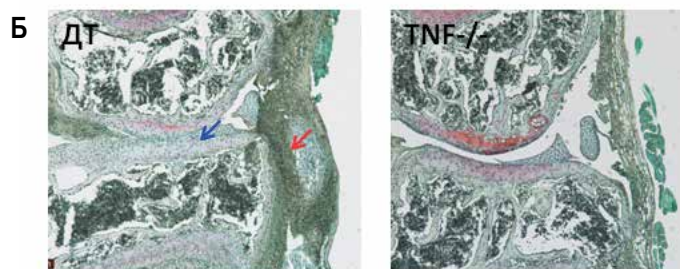


Рисунок 1. Мыши, дефицитные по TNF, не развивают артрит, индуцированный пассивным переносом антител к коллагену

Примечание. Примечание к рисунку Б и рисунки А, В, Г см. на с. 572.

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ИНТЕРНАЛИЗАЦИЯ АНТИМИКРОБНОГО ПЕПТИДА АЦИПЕНСИНА 1 В ОПУХОЛЕВЫЕ КЛЕТКИ ЧЕЛОВЕКА» (АВТОРЫ: УМНЯКОВА Е.С., КУДРЯВЦЕВ И.В., ГРУДИНИНА Н.А., БАЛАНДИН С.В., БОЛОСОВ И.А., ПАНТЕЛЕЕВ П.В., ФИЛАТЕНКОВА Т.А., ОРЛОВ Д.С., ЦВЕТКОВА Е.В., ОВЧИННИКОВА Т.В., КОКРЯКОВ В.Н., ШАМОВА О.В. (с. 575-582)

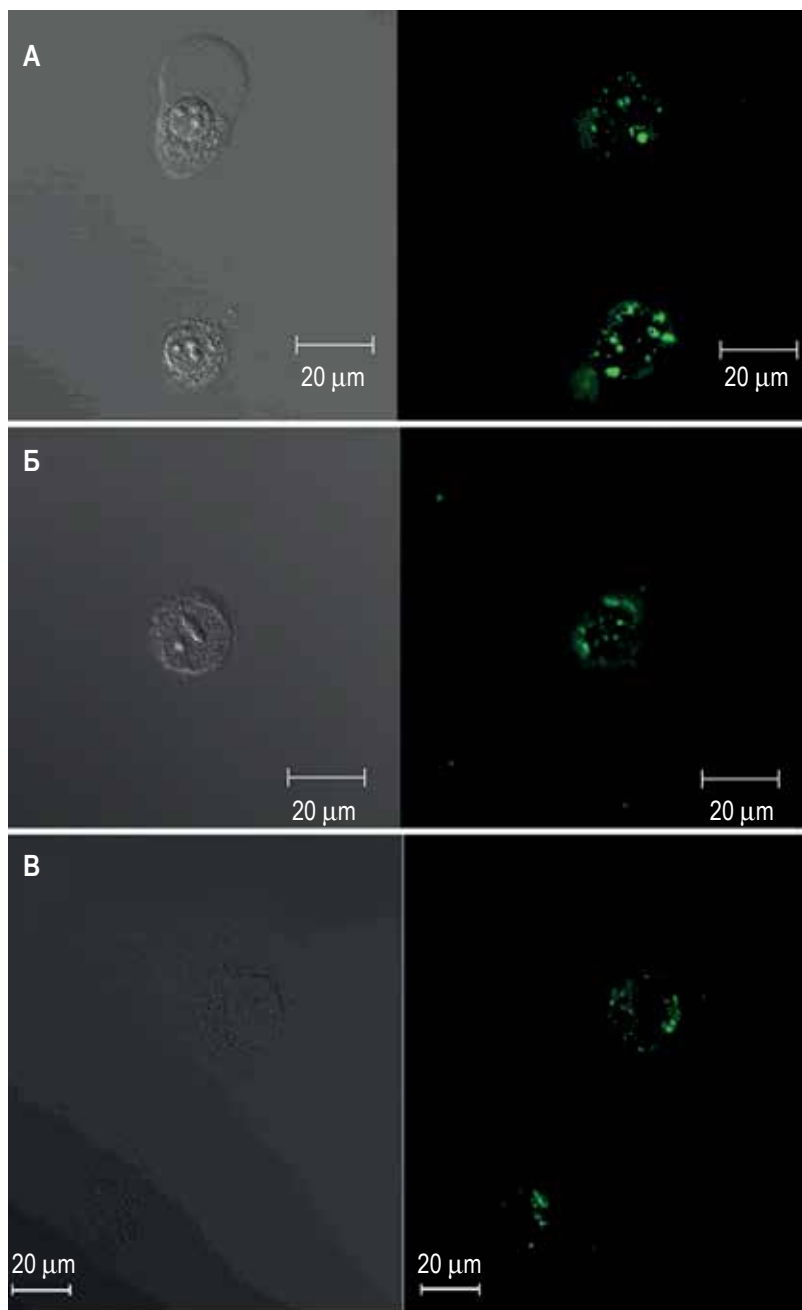


Рисунок 1. Изображения препаратов клеток эритромиелоидного лейкоза человека K-562, полученные с использованием конфокальной микроскопии, после инкубации клеток с меченым пептидом Ac1-BODIPY (25 мкМ) в течение 5 мин (А), 15 мин (Б) и 40 мин (В) при 37 °С

Примечание. Дифференциально-интерференционный контраст, средняя панель – флуоресценция, обусловленная присутствием меченого флуорофором Ac1, при возбуждении лазером с длиной волны 488 нм (зеленый). Препараты просматривали непосредственно после окончания эксперимента без фиксации клеток. Показаны оптические срезы, проходящие примерно через ядра клеток. Для каждого изображения приведена шкала (20 мкм).

Рисунки Г, Д, Е см. на с. 579.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

