

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

Том 19, № 1. С. 1-104

2017

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

KEDRION

BIOPHARMA

Keep Life Flowing

И.Г.Вена

ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНЫЙ
РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ

ВЫСОКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ВСЕМ НУЖНЫ



www.kedrion.com

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

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

январь-февраль

2017, том 19

№ 1

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, академик 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 последипломного образования Минздрава России, Москва, Россия

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

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

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

Козлов Владимир Александрович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, научный руководитель НИИ фундаментальной и клинической иммунологии Сибирского отделения РАН, Новосибирск, Россия

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник 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@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Подписано в печать 23.12.2016 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 13. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1001

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, академик 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, член-корреспондент РАН, 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, научный руководитель ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

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

Редакционный совет

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

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

Михалеk 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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

January-February

2017, volume 19

No. 1

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS full member, St. Petersburg Pasteur Institute of Epidemiology and Microbiology, Director, Laboratory of Molecular Immunology and Seroepidemiology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Editorial Board

Ludmila A. Goriachkina – PhD, MD, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgraduate Medical Education, Department of Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Sergei A. Ketlinskij – PhD, Professor, RAS corresponding member, St. Petersburg Institute of Pure Biochemicals, Deputy-director on Science, St. Petersburg, Russian Federation

Vladimir B. Klimovich – PhD, MD, Professor, Russian Center of Radiology and Surgery Technologies, Laboratory of Hybridoma technology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Vladimir A. Kozlov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Scientific Director, Novosibirsk, Russian Federation

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, 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 full 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 23.12.2016. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 13. 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, RAS corresponding member, 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, Scientific 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

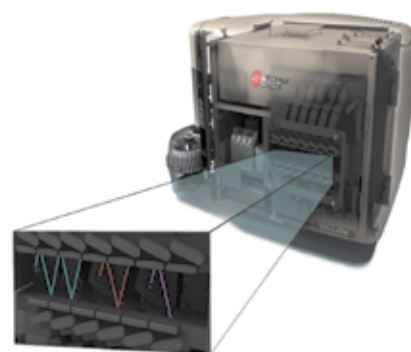
Yevgeny Tendler – PhD, MD, Department of Clinical Biochemistry, Rambam Medical Center, Haifa, Israel

Gallios – совершенный проточный цитофлуориметр для научных исследований

GALLIOS

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

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



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

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



KALUZA

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

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



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



Рисунок 1. Пациент Д., мальчик (слева) и пациентка Л., девочка (справа)
Figure 1. Patient D (boy, left), and patient L (girl, right)

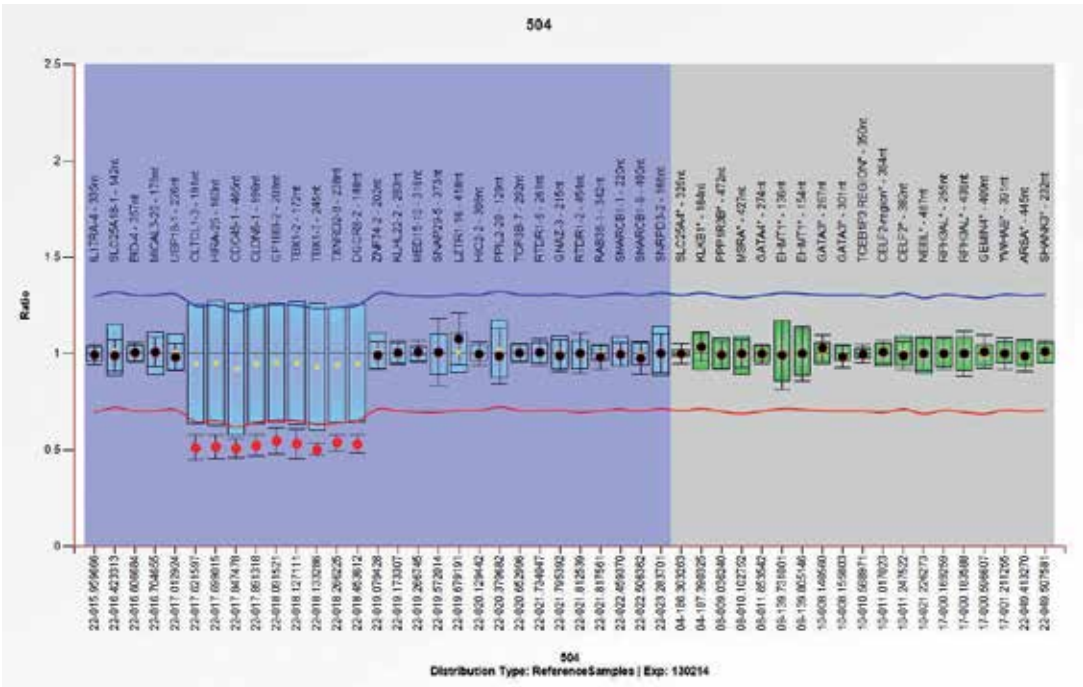


Рисунок 2. Результат анализа доз генов методом MLPA для девочки-пробанда
Примечание. Выявлена делеция региона LCR22-A размером 1,5 миллиона пар оснований.
Figure 2. Result of gene dosage analysis by means of MLPA approach for the female proband
Note. A deletion of LCR22 region (1.5 million base pairs) has been detected.

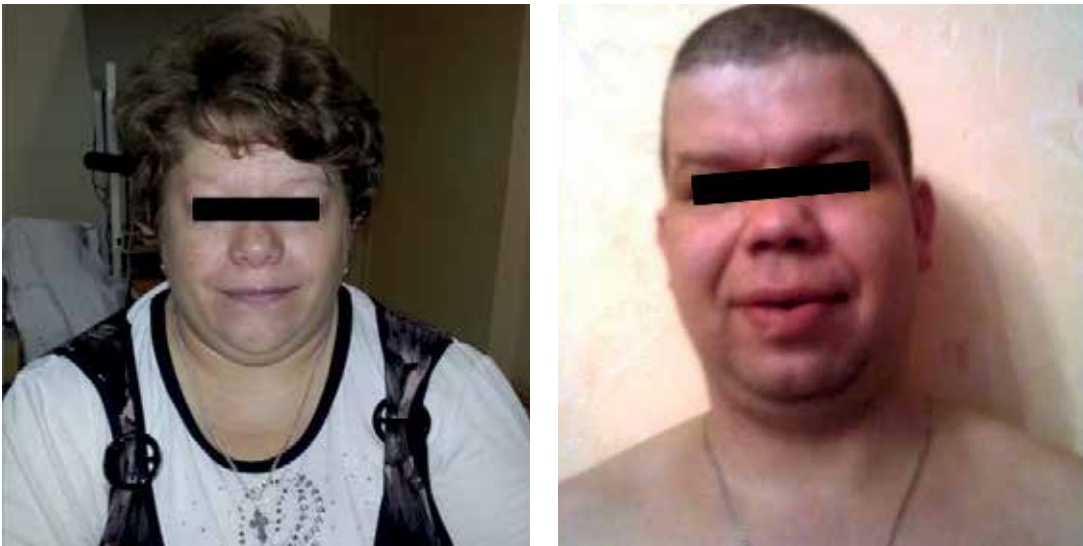


Рисунок 3. Мать (слева) и отец (справа) детей с синдромом делеции 22q11.2
Figure 3. Mother (left) and father (right) of the children with 22q11.2 deletion syndrome

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Останин А.А.

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ЛЕЧЕНИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ 7

Михайлова В.А., Белякова К.Л., Сельков С.А., Соколов Д.И.

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НК-КЛЕТОК: CD56^{dim} И CD56^{bright} НК-КЛЕТКИ ВО ВРЕМЯ И ВНЕ БЕРЕМЕННОСТИ..... 19

Оригинальные статьи

Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Ершов Ф.И.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ И СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ TLR-1 МОНОЦИТОВ В МАКРОФАГ-ПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОРБОЛ-МИРИСТАТ-АЦЕТАТА (РМА) 27

Горелова И.С., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Симакова А.И., Зенин И.В.

СОСТОЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ HCV-АССОЦИИРОВАННОМ ФИБРОЗЕ ПЕЧЕНИ..... 35

Савченко А.А., Борисов А.Г., Здзиковецкий Д.Э., Кудрявцев И.В., Медведев А.Ю., Мошев А.В., Гвоздев И.И.

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ 45

Карпук И.Ю.

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЕЙ НЕОПТЕРИНА И IFN γ У ПАЦИЕНТОВ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА И НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ..... 55

Барабаш Е.Ю., Калинина Е.П., Гвозденко Т.А., Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Антонюк М.В., Ходосова К.К.

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ЧАСТИЧНО КОНТРОЛИРУЕМОЙ И КОНТРОЛИРУЕМОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ..... 65

Дрозденко Т.С., Корнева Н.В., Старшинова А.А., Довгальук И.Ф., Харит С.М.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНЫ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ..... 73

Краткие сообщения

Абакушина Е.В., Лысюк Е.Ю., Посвятенко А.В., Кибардин А.В.

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ АКТИВИРУЮЩЕГО РЕЦЕПТОРА NKG2D НА НК-КЛЕТКАХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ MICA..... 81

Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко (Семакова) П.Н., Олейник В.М.

РОЛЬ Treg-КЛЕТОК В АДЕНОЗИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ ИММУННОЙ СУПРЕССИИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ..... 89

Случай из практики

Тузанкина И.А., Дерябина С.С., Власова Е.В., Болков М.А.

СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ СИНДРОМА ДИ ДЖОРДЖИ (СИНДРОМА ДЕЛЕЦИИ 22q11.2) 95

Правила для авторов 101

Авторский указатель 104

Предметный указатель 104

CONTENTS

Reviews

Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Ostanin A.A.

THE ROLE OF MACROPHAGES IN DAMAGE RECOVERY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM: NEW OPTIONS FOR TREATMENT OF NEUROLOGICAL DISORDERS 7

Mikhailova V.A., Belyakova K.L., Selkov S.A., Sokolov D.I.

PECULIARITIES OF NK CELLS DIFFERENTIATION: CD56^{dim} AND CD56^{bright} NK CELLS AT PREGNANCY AND IN NONPREGNANT STATE 19

Original articles

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Ershov F.I.

REGULATION OF TLR/RLR GENE ACTIVITY AND SYNTHESIS OF CYTOKINES DURING PHORBOL MYRISTATE ACETATE (PMA)-INDUCED DIFFERENTIATION OF THP-1 MONOCYTES INTO MACROPHAGE-LIKE CELLS 27

Gorelova I.S., Sklyar L.F., Markelova E.V., Simakova A.I., Zenin I.V.

EXTRACELLULAR MATRIX CONDITION IN CASE OF HCV-ASSOCIATED LIVER FIBROSIS 35

Savchenko A.A., Borisov A.G., Zdzitovetskiy D.E., Kudryavtsev I.V., Medvedev A.Yu., Moshev A.V., Gvozdev I.I.

PHENOTYPIC PROFILE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS 45

Karpuk I.Yu.

CORRELATION OF NEOPTERINE AND IFN γ LEVELS IN THE PATIENTS WITH EXACERBATION OF CHRONIC PERIODONTITIS AND INTOLERANCE OF DENTAL MATERIALS 55

Barabash E.Yu., Kalinina E.P., Gvozdenko T.A., Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Khodosova K.K.

REGULATION OF IMMUNE RESPONSE OF PATIENTS WITH PARTIALLY CONTROLLED vs CONTROLLED BRONCHIAL ASTHMA 65

Drozdenco T.S., Korneva N.V., Starshinova A.A., Dovgalyuk I.F., Kharith S.M.

EFFICIENCY OF PNEUMOCOCCAL VACCINE IN CHILDREN WITH DIFFERENT PATTERNS OF TUBERCULOSIS INFECTION 73

Short communications

Abakushina E.V., Lyssuk E.Yu., Posvyatenko A.V., Kibardin A.V.

INHIBITION OF THE NKG2D ACTIVATING RECEPTOR EXPRESSION ON CYTOTOXIC LYMPHOCYTES BY RECOMBINANT MICA PROTEIN 81

Zhulai G.A., Oleinik E.K., Churov A.V., Romanov A.A., Kravchenko (Semakova) P.N., Oleinik V.M.

SIGNIFICANCE OF Treg CELLS FOR ADENOSINE-MEDIATED IMMUNE SUPPRESSION IN COLORECTAL CANCER 89

Clinical case

Tuzankina I.A., Deryabina S.S., Vlasova E.V., Bolkov M.A.

FAMILIAL CASE OF CHROMOSOME 22q11.2 DELETION SYNDROME 95

Instructions to Authors 101

Author index 104

Subject index 104

РОЛЬ МАКРОФАГОВ В ВОССТАНОВЛЕНИИ ПОВРЕЖДЕНИЙ ЦЕНТРАЛЬНОЙ НЕРВНОЙ СИСТЕМЫ: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ЛЕЧЕНИИ НЕВРОЛОГИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ

Черных Е.Р., Шевела Е.Я., Останин А.А.

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

Резюме. Смена существующих парадигм относительно регенеративного потенциала центральной нервной системы (ЦНС) и роли иммунных клеток в процессах восстановления поврежденной нервной ткани открывают новые перспективы лечения неврологических расстройств на основе иммуно-терапевтических подходов. Настоящий обзор посвящен анализу роли макрофагов в восстановлении повреждений в ЦНС и включает данные о функциональной гетерогенности клеток микроглии и макрофагов моноцитарного происхождения, путях рекрутирования моноцитов в ЦНС, взаимоотношении клеток микроглии и рекрутируемых макрофагов и балансе М1/М2-клеток при нейропатологии. Кроме того, в обзоре приводится экспериментальное обоснование участия макрофагов в восстановлении повреждений ЦНС и рассматриваются механизмы регенеративной активности макрофагов. Приведенные данные позволяют рассматривать макрофаги в качестве новой мишени терапевтических воздействий для подавления нейровоспалительной реакции и усиления репаративных процессов. Первые шаги в этой области свидетельствуют о перспективности применения моноцитов/макрофагов или технологий М1→М2 переключения в лечении неврологических расстройств и обосновывают необходимость дальнейших исследований в данном направлении.

Ключевые слова: ЦНС, макрофаги, микроглия, макрофаги моноцитарного происхождения, функциональные фенотипы, нейропротекция, нейрорегенерация, ангиогенез, ДЦП, инсульт, регенеративная иммунотерапия

THE ROLE OF MACROPHAGES IN DAMAGE RECOVERY OF CENTRAL NERVOUS SYSTEM: NEW OPTIONS FOR TREATMENT OF NEUROLOGICAL DISORDERS

Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Ostanin A.A.

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

Abstract. Evolution of existing paradigms on regenerative capacity of the central nervous system (CNS) and eventual role of immune cells in restoration of damaged nervous tissue offers new prospectives in treatment

Адрес для переписки:

Черных Елена Рэмовна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 236-03-29.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Address for correspondence:

Chernykh Elena R.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaia str. 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Р. Черных, Е.Я. Шевела, А.А. Останин «Роль макрофагов в восстановлении повреждений центральной нервной системы: новые возможности в лечении неврологических расстройств» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 7-18. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-7-18

For citation:

E.R. Chernykh, E.Ya. Shevela, A.A. Ostanin "The role of macrophages in damage recovery of central nervous system: new options for treatment of neurological disorders", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 7-18.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-7-18

© Черных Е.Р. и соавт., 2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-7-18>

of neurological disorders based on immunotherapeutic approaches. Present review article addresses a role of macrophages in restoration of damaged CNS and provides data on functional heterogeneity of resident tissue macrophages (microglia), and monocyte-derived macrophages. We discuss possible ways of monocyte recruitment to CNS, relationships between microglia and recruited macrophages, as well as M1/M2 balance in neurological conditions. Moreover, the review proposes an experimental rationale for macrophage engagement into the CNS damage reconstruction, and concerns the mechanisms of macrophage regenerative activity. In summary, the data presented here allow us to suggest macrophages as a novel therapeutic target for suppression of neuroinflammation and enhancement of reparative processes. The first steps in the field are encouraging, with respect to clinical application of monocytes/macrophages or M1→M2 switching technologies for treatment of the neurological disorders, thus presuming a need for further research in this direction.

Keywords: central nervous system, macrophages, microglia, monocyte-derived macrophages, functional phenotypes, neuroprotection, neuroregeneration, angiogenesis, cerebral palsy, stroke, regenerative immunotherapy

Введение

Последние годы ознаменовались пересмотром существующих парадигм относительно регенеративного потенциала центральной нервной системы (ЦНС) и роли иммунных клеток в восстановлении поврежденной нервной ткани. Во-первых, стало очевидно, что головной и спинной мозг у взрослого человека остается пластичным и при повреждении обладает регенеративной способностью [40], хотя значительно в меньшей степени по сравнению с другими органами и тканями. Во-вторых, выяснилось, что иммунологическая привилегированность ЦНС не является абсолютной, и иммунные клетки проникают в ткани мозга, особенно в условиях патологии [43]. В-третьих, была существенно переосмыслена роль иммунных клеток и показано, что для восстановления поврежденной нервной ткани необходима активация макрофагов и клеток микроглии [21], которые удаляют клеточный детрит и осуществляют тонкую регуляцию нейрорегенеративных процессов [15, 35, 57, 79].

Целью настоящего обзора является представление данных о роли макрофагов в восстановлении повреждений в ЦНС и механизмах регенеративной активности макрофагов, а также обсуждение возможности использования макрофагов в качестве новой мишени терапевтических воздействий при лечении неврологических расстройств.

«Неиммунные» функции макрофагов

Макрофаги, открытые Мечниковым И.И. более 100 лет тому назад, долгое время воспринимались исключительно как клетки, защищающие от бактерий и патогенов. Однако позднее стало ясно, что функции этих клеток намного шире. Макрофаги в период эмбрионального развития определяют направленность дифференцировки клеток и их дальнейшую судьбу (т.е. выбор между выживаемостью и апоптозом), осуществ-

ляют элиминацию апоптотических клеток, контролируют тканевую морфогенез, а также обеспечивают структурирование сосудистой сети, участвуя в процессах ангиогенеза, образования сосудистых анастомозов, деградации внеклеточного матрикса и индукции апоптоза эндотелиоцитов. В постнатальном периоде макрофаги обеспечивают поддержание гомеостаза, причем не только на уровне антигенного постоянства, но и на уровне поддержания пула циркулирующих лейкоцитов, контроля артериального давления (поддержание натриевого гомеостаза), регуляции липидного обмена, поддержания репродуктивной функции (овуляция, сперматогенез). Кроме того, недавние исследования показали, что моноциты и резидентные макрофаги играют центральную роль в процессах репарации и регенерации, задействуя свойства, проявляемые в эмбриогенезе [3, 78]. Макрофаги обладают высокой пластичностью и при повреждении тканей способны приобретать различные функциональные фенотипы: с провоспалительной, профиброгенной, противовоспалительной, антифиброгенной и регенеративной активностями. Тонко регулируемая смена этих фенотипов позволяет макрофагам контролировать воспалительную реакцию (инициацию, развитие и разрешение), функции паренхиматозных и стволовых клеток, участвующих в образовании новых тканей, и ремоделирование тканей [6, 86].

Функциональная гетерогенность макрофагов и клеток микроглии

В ЦНС макрофаги представлены 2 типами клеток — микроглией и макрофагами моноцитарного происхождения. Первые являются резидентными макрофагами, которые заселяют головной мозг из желточного мешка в эмбриогенезе и являются самообновляющимися. Вторые имеют костно-мозговое происхождение и обра-

зуются из циркулирующих моноцитов, которые рекрутируются в ткани мозга [41, 62].

Активация макрофагов и последующий запуск нейровоспалительной реакции могут вызывать как повреждение нервной ткани, так и процессы ее восстановления [17, 46]. Двойственную функцию макрофагов связывают с их гетерогенностью. Выделяют как минимум два функциональных субтипа макрофагов — M1- и M2-клетки. M1-макрофаги обладают провоспалительными свойствами, обеспечивают защиту от патогенов, однако при этом являются нейродеструктивными и подавляют процессы репарации. M2-клетки, напротив, обеспечивают нейропротекцию и стимулируют нейрогенез, рост и миелинизацию аксонов, синаптогенез и ангиогенез [28, 33]. Важно отметить, что данная схема является, безусловно, упрощенной, и в реальной ситуации существует множество переходных функциональных фенотипов с уникальными биологическими свойствами. Так, например, M2-макрофаги включают несколько фенотипов, например M2a, M2b, M2c [59].

Рекрутирование макрофагов в ЦНС

Совершенствование методов визуализации клеток с помощью двухфотонной флуоресцентной микроскопии, позитронноэмиссионной и магнитнорезонансной томографии позволило продемонстрировать способность клеток микроглии и макрофагов мигрировать в зону повреждения и выявить их взаимосвязь с морфологическими изменениями в ЦНС. При этом использование химерных животных, сделавшее возможным разделение клеток микроглии и рекрутируемых макрофагов, показало, что миграция моноцитов из циркуляции в ЦНС осуществляется 3 путями — через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), гематоликворный барьер и гематолептоменингеальный барьер [23, 37, 52, 72]. В первом случае моноциты мигрируют из паренхиматозных капилляров в ткани мозга, во втором — из капилляров сосудистых сплетений в спинномозговую жидкость желудочков головного мозга, и в третьем — из сосудов мягкой и паутинной мозговой оболочки в ликвор субарахноидального пространства. ГЭБ является наиболее сложно проходимым. В физиологических условиях моноциты могут попадать только в периваскулярное пространство, но при патологии способны разрушать базальную мембрану и мигрировать в паренхиму мозга. Миграция через гематоликворный барьер включает экстравазацию клеток из капилляров сосудистых сплетений в строум ворсин и после-

дующую трансэпителиальную миграцию в ликворное пространство. Поскольку капилляры ворсин фенестрированы, а эпителиальные клетки соединены менее прочно, чем эндотелиоциты ГЭБ, этот барьер проходим даже при физиологических условиях. Миграция моноцитов из сосудов мягкой и паутинной мозговой оболочки в заполненное ликвором субарахноидальное пространство в норме не происходит, однако при патологии активированные моноциты с провоспалительными свойствами проходят этот барьер и могут далее проникать в паренхиму мозговой ткани под мягкой мозговой оболочкой [12, 43].

M1- и M2-макрофаги мигрируют в зону повреждения различными путями. Так, в модели травмы спинного мозга показано, что миграция M1-макрофагов моноцитарного происхождения (Ly6c^{hi}CX3CR1^{lo}) осуществляется через примыкающую к зоне повреждения мягкую и паутинную оболочки гематолептоменингеального барьера и контролируется хемокином CCL2. В то же время M2 макрофаги (Ly6c^{lo}CX3CR1^{hi}) мигрируют через отдаленный от очага повреждения гематоликворный барьер. В этом случае миграция из сосудистого сплетения желудочков мозга в ликвор осуществляется с участием молекул адгезии VCAM-1/VLA-4 и CD73-экзофермента эпителиальных клеток, обеспечивающих, соответственно, экстравазацию макрофагов в строум ворсин и последующую трансмиграцию через эпителиальный барьер [74].

Взаимоотношение клеток микроглии и макрофагов

В норме макрофаги в ЦНС представлены преимущественно клетками микроглии, которые поддерживает нейрогенез, функционирование синапсов и нейронов. При кратковременной и умеренной активации клетки микроглии приобретают M2 нейропротективный фенотип. В то же время интенсивная острая или хроническая активация приводит к индукции нейротоксического M1-фенотипа. В этой ситуации недостаточность нейропротективной активности восполняется рекрутированием макрофагов с периферии и поляризацией их в M2-клетки [41].

Индукторами M2-поляризации в ЦНС являются экспрессируемые в нервной ткани молекулы, концентрация которых возрастает при патологии. Продуцентами поляризующих факторов, наряду с нервными клетками, могут быть эндотелиоциты, рекрутируемые лейкоциты и экстрацеллюлярные белки. В частности, M2-поляризующей активностью в ЦНС обла-

дают протеогликаны внеклеточного матрикса; иммуносупрессивные цитокины — IL-4, IL-10, TGF β , IL-25; галектин-1; костный морфогенетический белок-7 (BMP-7); нейропептид субстанция Р; продуцируемый нейронами хемокин CCL-2 [2, 22, 30, 48, 67, 68, 77, 81].

М1- и М2-клетки при нейропатологии

В отличие от других тканей, где поляризация в М2-клетки носит стойкий характер, при патологии ЦНС М2-фенотип индуцируется только в части рекрутируемых макрофагов [33] и является обратимым [34]. Так, в моделях острых поражений спинного и головного мозга М2-фенотип рекрутируемых макрофагов через неделю сменяется на М1-фенотип [27, 29, 83]. При этом в модели спинальной травмы показано, что уменьшение М2-клеток в пораженной области ассоциировано с увеличением зоны повреждения и гибелью двигательных нейронов [73]. Напротив, увеличение доли М2-клеток уменьшает размеры зоны повреждения и предотвращает гибель нейронов [33, 75]. Доминирование М1-клеток является причиной пролонгированной воспалительной реакции и во многом обуславливает отсутствие адекватного ремоделирования аксонов. Одним из механизмов М2→М1 переключения в этом случае является поглощение миелинового дебриса, которое индуцирует трансформацию макрофагов в пенистые клетки. Пенистые макрофаги, которые имеют провоспалительный фенотип, обладают нейротоксичностью и подавляют нормальные процессы репарации, способствуют образованию липидных бляшек и поддерживают хроническое воспаление [84].

В моделях хронических нейровоспалительных заболеваний (болезнь Паркинсона, рассеянный склероз) в поврежденных тканях ЦНС присутствуют клетки с М1- и М2-фенотипом, причем прогрессия неврологических расстройств ассоциирована с преимущественной активацией М1-клеток [51, 58]. Например, в модели аллергического энцефаломиелита показано, что соотношение М1/М2-клеток позволяет прогнозировать обострение [54], а блокирование М1-клеток или введение М2-клеток подавляет прогрессию заболевания [54, 55].

Механизмы действия М2-макрофагов

Механизмы, лежащие в основе регенеративной активности макрофагов, наиболее хорошо изучены при заживлении кожных ран и повреждений паренхиматозных органов. Макрофаги регулируют все три фазы раневого процесса: фазу воспаления, пролиферации (образования

новой ткани за счет деления выживших зрелых клеток, тканеспецифических стволовых клеток или костномозговых предшественников) и ремоделирования ткани [25, 38]. При этом, если первая фаза медируется с участием М1-клеток, то М2-макрофагам отводится ведущая роль в разрешении воспаления и регуляции клеточной пролиферации и тканевого ремоделирования. Аналогичные эффекты макрофагов имеют место и при восстановлении нервной ткани. Обладая повышенной способностью к фагоцитозу апоптотических клеток, М2-макрофаги обеспечивают элиминацию клеточного детрита (в том числе нейротоксических и ингибиторных молекул) и продуцируют противовоспалительные цитокины, т.е. подавляют воспалительный ответ [73]. Кроме того, М2-клетки продуцируют цитокины и ростовые факторы, активирующие нейрогенез, олигодендрогенез и ангиогенез, способствуя появлению новых клеточных элементов [5, 87]. Наконец, М2-клетки через продукцию трофических и ростовых факторов обеспечивают ремоделирование аксонов, т.е. создание новых аксональных коллатералей за счет стимуляции роста аксонов, формирования новых синапсов и ремиелинизации аксонов [29, 57, 66]. Это позволяет сформировать обходной путь проведения сигналов, минуя область повреждения. В таблице 1 приведен перечень продуцируемых М2-клетками факторов, которые оказывают нейропротективное действие и стимулируют нейрогенез, олигодендрогенез, рост аксонов, синаптогенез и ангиогенез.

Нейрорегенеративная активность М2-макрофагов

Первые экспериментальные данные, указывающие на возможную причастность макрофагов к нейрорегенерации, были опубликованы в 1993 г., когда Hikawa N. с соавт. продемонстрировали *in vitro*, что после поглощения клеточного детрита макрофаги продуцируют факторы, стимулирующие выживаемость нейронов и регенерацию аксонов [26]. Позднее роль М2-клеток была подтверждена на моделях различных заболеваний и повреждений ЦНС *in vivo*. Эти исследования показали, что увеличение М2-клеток в зоне повреждения улучшает неврологическое восстановление, тогда как элиминация М2-клеток или подавление их активности ухудшает неврологические исходы и сопряжено с прогрессией нейропатологии.

Так, в модели острого повреждения спинного мозга показано, что восстановление моторных функций сопряжено с рекрутированием в зону

ТАБЛИЦА 1. ТРОФИЧЕСКИЕ И РОСТОВЫЕ ФАКТОРЫ, ПРОДУЦИРУЕМЫЕ М2-МАКРОФАГАМИ

TABLE 1. TROPHIC AND GROWTH FACTORS PRODUCED BY M2 MACROPHAGES

Факторы Regulatory factors	Эффекты Effects				
	Нейропротекция Neuroprotection	Нейрорегенерация Neuroregeneration			Ангиогенез Angiogenesis
		Нейрогенез Neurogenesis	Олигодендрогенез Oligodendrogenesis	Рост аксонов синаптогенез Axonal growth Synaptogenesis	
BDNF	+	+	+	+	+
GDNF	+	+	+	+	
IGF-1	+	+	+	+	+
NGF	+	+	+	+	+
NT-4/5	+	+		+	
IL-10	+				
VEGF	+	+		+	+
PDGF	+	+	+		+
Galectin3		+			
Osteopontin		+			
Activin A			+		
Oncomodulin				+	
Protease serine 2		+			
CXCL12				+	

Примечание. BDNF – нейротрофический фактор мозга (brain-derived neurotrophic factor); GDNF – нейротрофический фактор глиальных клеток (glial cell-derived neurotrophic factor); IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста-1 (insulin-like growth factor-1); NGF – фактор роста нервов (nerve growth factor); NT-4/5 – нейротрофин-4/5 (neurotrophin-4/5); VEGF – фактор роста эндотелия сосудов (vascular endothelial growth factor); PDGF – тромбоцитарный фактор роста (platelet-derived growth factor); CXCL12 – лиганд CXC-хемокина12.

Note. BDNF, brain-derived neurotrophic factor; GDNF, glial cell-derived neurotrophic factor; IGF-1, insulin-like growth factor-1; NGF, nerve growth factor; NT-4/5, neurotrophin-4/5; VEGF, vascular endothelial growth factor; PDGF, platelet-derived growth factor; CXCL12, CXC12 ligand.

повреждения М2-макрофагов, продуцирующих IL-10. У животных с нокаутом гена IL-10 неврологическое восстановление происходит значительно хуже [73]. Усиление миграции М2-макрофагов, индуцированное повышенной продукцией хемокина CCL2 (хемоаттрактант М2-макрофагов) в результате предварительного повреждения периферического нерва, улучшает восстановление двигательной активности [36]. Напротив, блокирование миграции М2-макрофагов за счет подавления экспрессии молекул VCAM-1/VLA-4 и эпителиального CD73-экзофермента, или механического нарушения тока спинномозговой жидкости снижает эффективность восстановления моторной функции [74]. Улучшение неврологического восстановления также наблюдается на фоне трансплантации макрофагов со свойствами М2-клеток [64] или индукции их поляризации [24].

Нейропротективный и регенеративный эффект М2-макрофагов продемонстрирован

не только в модели травматического повреждения спинного мозга. Внутривенное введение клеток микроглии человека (линии НМО6) значительно уменьшает неврологический дефицит в модели ишемического инсульта, что ассоциируется с подавлением воспалительной реакции (уменьшение глиоза, снижение количества апоптотических клеток) и усилением экспрессии генов нейротрофических факторов (GDNF, BDNF, VEGF, BMP-7) и противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-5) [60]. Поляризация в сторону М2-макрофагов на фоне интрацеребрального введения IL-4 также существенно улучшает восстановление неврологического статуса и поведенческих реакций в модели геморрагического инсульта [88]. С М2-поляризующей активностью связывают неврологическое улучшение в модели рассеянного склероза на фоне применения глатирамер ацетата [65], а также в моделях травматического и ишемического поражения головного мозга и различных нейровоспалительных заболе-

ваний на фоне использования агонистов PPAR рецепторов [39, 49].

Важно отметить, что позитивный эффект макрофагов проявляется не только в отношении восстановления чувствительной и двигательной активности, но и когнитивных функций. Так, у иммунодефицитных мышей с исходно сниженными параметрами когнитивных функций внутривенное введение генерированных *in vitro* М2-макрофагов значительно улучшало обучаемость и память животных в тесте водного лабиринта Морриса [16]. Simard A.R. с соавт. в трансгенной модели болезни Альцгеймера показали, что макрофаги костномозгового происхождения участвуют в элиминации амилоидных бляшек, обладая, таким образом, способностью ограничивать прогрессию когнитивных расстройств [76]. Позитивная роль М2-макрофагов продемонстрирована также в модели ишемической ретинопатии [42, 50].

Кооперация М2-макрофагов и стволовых клеток

Макрофаги могут во многом обуславливать неврологическое улучшение при трансплантации мононуклеарных клеток (МНК) костного мозга или пуповинной крови [1], которые в своем составе содержат всего лишь 1-2% стволовых клеток, однако включают значительную долю моноцитов. Действительно, Womble T.A. с соавт. в модели ишемического инсульта показали существенное снижение нейтропротективного потенциала МНК пуповинной крови после истощения моноцитов [85]. Кроме того, эффекты стволовых клеток могут в значительной степени опосредоваться через активацию М2-клеток. Например, клинический эффект мезенхимальных стромальных клеток (МСК) при повреждениях ЦНС во многом объясняется способностью МСК индуцировать поляризацию макрофагов в сторону М2-фенотипа [18]. Показано, что при внутривенном введении МСК секвестрируются в легких и индуцируют противовоспалительный фенотип альвеолярных макрофагов, что приводит к подавлению системной и интрацеребральной воспалительной реакции [82]. Другой механизм заключается в том, что стволовые клетки в условиях неблагоприятного микроокружения подвергаются апоптозу, и их поглощение индуцирует не только противовоспалительный фенотип, но и усиливает продукцию ростовых факторов (VEGF, IGF-1, PDGF, KGF, EPO) рекрутируемыми макрофагами [45]. Эффект стволовых кле-

ток на поляризацию тканевых макрофагов был недавно подтвержден Protti A. с соавт., которые показали, что трансплантация клеток костного мозга в модели острого инфаркта миокарда модулирует М2-фенотип тканевых макрофагов, что улучшает восстановление миокарда [63].

М1/М2-баланс как новая мишень терапевтических воздействий

Учитывая представленные выше данные о способности М2-макрофагов оказывать нейропротективный эффект и способствовать нейрорегенерации, трансплантация моноцитов/макрофагов может являться перспективной клеточной стратегией стимуляции репаративных процессов при патологии ЦНС [28, 58]. В отличие от устоявшегося термина «регенеративная медицина», ориентированная на преимущественное использование стволовых клеток и в меньшей степени дифференцированных паренхиматозных клеток, данное направление может быть обозначено как «регенеративная иммунотерапия».

Моноциты/макрофаги, обладая выраженным регенеративным потенциалом, являются привлекательными кандидатами для клеточной терапии и по сравнению со стволовыми клетками имеют ряд преимуществ — лишены онкогенной и тератогенной активности, продуцируют множество ростовых, трофических и проангиогенных факторов. Выделение моноцитов является относительно простой процедурой и не связано с этическими проблемами [70]. Источником моноцитов у взрослого человека являются костный мозг и периферическая кровь. В этом качестве большой интерес представляет также пуповинная кровь. Получение клеток пуповинной крови в настоящее время является воспроизводимой стандартизированной технологией. Кроме того, моноциты пуповинной крови, будучи незрелыми, отличаются низкой иммуногенностью, в сочетании с высокой противовоспалительной и проангиогенной активностями и склонны к поляризации в сторону М2-клеток [70, 71]. Действительно, трансплантация МНК пуповинной крови в модели ишемического инсульта оказывает противовоспалительный эффект, что проявляется существенным снижением продукции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1 β), уменьшением численности активированных клеток микроглии и усилением нейрогенеза [80]. Нейро-регенеративная роль моноцитов пуповинной крови продемонстрирована в различных моделях поражений ЦНС. Womble T.A. с соавт. показали,

что трансплантация клеток пуповинной крови в модели ишемического инсульта снижает размеры инфаркта, причем деплеция моноцитов увеличивает эту активность [85]. Улучшение локомоторных функций и памяти продемонстрировано при внутривенном введении МНК пуповинной крови животным в модели мукополисахаридоза IIIВ типа (синдром Sanfilippo В-типа) [20]. Pimentel-Coelho Р.М. с соавт. продемонстрировали позитивный эффект МНК пуповинной крови в модели неонатальной гипоксии-ишемии мозга у крыс. Внутривентральное введение МНК пуповинной крови улучшает сенсомоторные рефлексы, что ассоциируется с уменьшением гибели нейронов в стриатуме и уменьшением количества активированных клеток микроглии в коре головного мозга [61]. Неврологическое улучшение при трансплантации МНК пуповинной крови продемонстрировано также в моделях травмы головного и спинного мозга [7, 44], детского церебрального паралича (ДЦП) [53], болезни Альцгеймера [14] и бокового амиотрофического склероза [19].

Клиническая апробация клеток пуповинной крови показала безопасность и эффективность в лечении гипоксически-ишемической энцефалопатии новорожденных [13], ДЦП [31, 56] и аутизма [47].

Нами был разработан оригинальный протокол генерации М2-макрофагов из моноцитов крови человека в условиях дефицита ростовых факторов, в котором М2-фенотип индуцировался поглощением апоптотических клеток. Генерируемые макрофаги экспрессировали М2-ассоциированные и проапоптогенные молекулы и по сравнению с М1-клетками обладали сниженной секрецией провоспалительных цитокинов/хемокинов и низкой способностью стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток, но при этом характеризовались высокой продукцией ростовых и нейротрофических факторов (IGF-1, VEGF, EPO, BDNF, EGF, FGF-basic) [8, 69]. Пилотные клинические исследования аутологичных М2-клеток при церебральном инсульте и ДЦП показали, что интратекальное введение М2-клеток безопасно и не индуцирует системной воспалительной реакции. Клинический эффект у пациентов с тяжелыми формами ДЦП проявлялся значимым возрастанием моторной активности (в том числе тонкой моторики), улучшением когнитивных функций, снижением спастического синдрома и прекращением или ослаблением судорожного синдрома [9, 10].

Клинический эффект у пациентов с инсультом проявлялся в достоверном возрастании числа пациентов с положительной неврологической динамикой (снижение неврологического дефицита на 3 и более баллов по NIHSS) в группе с клеточной терапией по сравнению с группой сравнения [11].

Эти первые результаты, характеризующие безопасность и терапевтический потенциал моноцитов/макрофагов в лечении неврологических расстройств, подтверждают перспективность применения М2-клеток. Вместе с тем трансляция технологий на основе применения моноцитов/макрофагов требует выяснения многих вопросов касательно оптимального пути введения клеток, дозы вводимых клеток и времени проведения терапии. Еще одним важным аспектом, который может ограничивать эффективность терапии, является функциональная лабильность макрофагов, которые могут терять М2-фенотип после трансплантации. В этом плане использование генно-модифицированных М2-клеток может повысить стабильность их функциональных свойств. Другой альтернативой может быть использование продуцируемых макрофагами растворимых факторов. Некоторые из этих факторов, такие как IGF-1 и онкомодулин, уже были протестированы в моделях поражений ЦНС и показали эффективность [89, 90]. Однако применение отдельных факторов не может заменить позитивный эффект М2-макрофагов, включающий аддитивное и синергичное действие множества нейропротективных и нейрорегенеративных молекул. В этом аспекте выявление внеклеточных и внутриклеточных сигнальных путей, детерминирующих М1- и М2-фенотип макрофагов, открывает дополнительные подходы к регенеративной иммунотерапии. Одним из таких подходов является активация М2-фенотипа и подавление М1-фенотипа с помощью регуляции сигнальных путей. Другим — повышение в микроокружении макрофагов факторов, индуцирующих М2-поляризацию [28]. В этом аспекте уместно отметить, что используемые в лечении рассеянного склероза препараты на основе глатирамер ацетата и интерферона-бета обладают способностью индуцировать поляризацию макрофагов в сторону М2-фенотипа [4, 32].

Разработка новых иммунотерапевтических подходов, нацеленных на регуляцию функций макрофагов и/или их применение в качестве новой клеточной платформы, является, несомненно, перспективным направлением как в области

регенеративной медицины в целом, так и при лечении неврологических расстройств в частности. При этом необходимо учитывать, что, несмотря на важную роль различных типов М2-клеток в восстановлении повреждений в ЦНС, провоспалительные М1-клетки также необходимы для запуска эффективной репарации. Более того,

длительное доминирование М2-фенотипа может оказывать негативное действие на противоинфекционную и противоопухолевую защиту. Поэтому такие параметры, как доза используемых клеток, продолжительность терапии и время ее проведения, должны тщательно обосновываться при разработке протоколов терапии.

Список литературы / References

1. Bachstetter A.D., Pabon M.M., Cole M.J., Hudson C.E., Sanberg P.R., Willing A.E., Bickford P.C., Gemma C. Peripheral injection of human umbilical cord blood stimulates neurogenesis in the aged rat brain. *BMC Neurosci.*, 2008, Vol. 9, no. 22, 9 p.
2. Beers D.R., Henkel J.S., Zhao W., Wang J., Huang A., Wen S., Liao B., Appel S.H. Endogenous regulatory T lymphocytes ameliorate amyotrophic lateral sclerosis in mice and correlate with disease progression in patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Brain*, 2011, Vol. 134, no. 5, pp. 1293-1314.
3. Brown B.N., Sicari B.M., Badylak S.F. Rethinking regenerative medicine: amacrophage-centered approach. *Front Immunol.*, 2014, Vol. 5, Article 510, 11 p.
4. Burger D., Molnarfi N., Weber M.S., Brandt K.J., Benkhoucha M., Gruaz L., Chofflon M., Zamvil S.S., Lalive P.H. Glatiramer acetate increases IL-1 receptor antagonist but decreases T cell-induced IL-1 β in human monocytes and multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, Vol. 106, no. 11, pp. 4355-4359.
5. Butovsky O., Ziv Y., Schwartz A., Landa G., Talpalar A.E., Pluchino S., Martino G., Schwartz M. Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2006, Vol. 31, no. 1, pp. 149-160.
6. Chazaud B. Macrophages: supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology*, 2014, Vol. 219, no. 3, pp. 172-178.
7. Chen C.T., Foo N.H., Liu W.S., Chen S.H. Infusion of human umbilical cord blood cells ameliorates hind limb dysfunction in experimental spinal cord injury through anti-inflammatory, vasculogenic and neurotrophic mechanisms. *Pediatr Neonatol.*, 2008, Vol. 49, no. 3, pp. 77-83.
8. Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Petrovsky Ya.L., Ostanin A.A. The generation and properties of human M2-like macrophages: potential candidates for CNS repair? *Cell. Ther. Transplant.*, 2010, Vol. 2, no. 6, e000080.01.
9. Chernykh E.R., Kafanova M.Yu., Shevela E.Y., Adonina E.I., Sakhno L.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A. Autologous M2-like macrophage applications in children with cerebral palsy. *Cell. Ther. Transplant.*, 2011, Vol. 3, no. 11, e000092.01.
10. Chernykh E.R., Kafanova M.Yu., Shevela E.Ya., Sirota S.I., Adonina E.A., Ostanin A.A., Kozlov V.A. Clinical experience with autologous M2-macrophages in children with severe cerebral palsy. *Cell. Transplant.*, 2014, Vol. 23, Suppl. 1, pp. 97-104.
11. Chernykh E.R., Shevela E.Ya., Starostina N.M., Morozov S.A., Davydova M.N., Menyaeva E.V., Ostanin A.A. Safety and therapeutic potential of M2-macrophages in stroke treatment. *Cell. Transplant.*, 2016, Vol. 25, no. 8, pp. 1461-1471.
12. Corraliza I. Recruiting specialized macrophages across the borders to restore brain functions. *Front. Cell. Neurosci.*, 2014, Vol. 8, Article 262, 7 p.
13. Cotten C.M., Murtha A.P., Goldberg R.N., Grotegut C.A., Smith P.B., Goldstein R.F., Fisher K.A., Gustafson K.E., Waters-Pick B., Swamy G.K., Rattray B., Tan S., Kurtzberg J. Feasibility of autologous cord blood cells for infants with hypoxic-ischemic encephalopathy. *J. Pediatr.*, 2014, Vol. 164, no. 5, pp. 973-979.
14. Darlington D., Deng J., Giunta B., Hou H., Sanberg C.D., Kuzmin-Nichols N., Zhou H., Mori T., Ehrhart J., Sanberg P.R., Tan J. Multiple low-dose infusions of human umbilical cord blood cells improve cognitive impairments and reduce amyloid-beta-associated neuropathology in Alzheimer mice. *Stem Cells Dev.*, 2013, Vol. 22, no. 3, pp. 412-421.
15. David S., Kroner A. Repertoire of microglial and macrophage responses after spinal cord injury. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2011, Vol. 12, no. 7, pp. 388-399.
16. Derecki N.C., Quinlins K.V., Kipnis J. Alternatively activated myeloid (M2) cells enhance cognitive function in immune compromised mice. *Brain Behav. Immun.*, 2011, Vol. 25, no. 3, pp. 379-385.
17. Donnelly D.J., Popovich P.G. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp. Neurol.*, 2008, Vol. 209, no. 2, pp. 378-388. doi: 10.1016/j.expneurol.2007.06.009

18. Eggenhofer E., Hoogduijn M.J. Mesenchymal stem cell-educated macrophages. *Transplant. Res.*, 2012, Vol. 1, p. 12.
19. Garbuzova-Davis S., Rodrigues M.C., Mirtyl S., Turner S., Mitha S., Sodhi J. Multiple intravenous administrations of human umbilical cord blood cells benefit in a mouse model of ALS. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 2, e31254.
20. Garbuzova-Davis S., Xie Y., Danias P., Sanberg C.D., Klasko S.K., Sanberg P.R. Transplantation of cord blood monocyte/ macrophage cells to treat Sanfilippo type B. *Cell. Transplant.*, 2008, Vol. 17, no. 4, pp. 466-467.
21. Gensel J.C., Zhang B. Macrophage activation and its role in repair and pathology after spinal cord injury. *Brain Res.*, 2015, Vol. 1619, pp. 1-11.
22. Gong D., Shi W., Yi S.J., Chen H., Groffen J., Heisterkamp N. TGF-beta signaling plays a critical role in promoting alternative macrophage activation. *BMC Immunol.*, 2012, Vol. 13, p. 31.
23. Greenwood J., Heasman S.J., Alvarez J.I., Prat A., Lyck R., Engelhardt B. Leukocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, 2011, Vol. 37, no. 1, pp. 24-39.
24. Guerrero A.R., Uchida K., Nakajima H., Watanabe S., Nakamura M., Johnson W.E., Baba H. Blockade of interleukin-6 signaling inhibits the classic pathway and promotes an alternative pathway of macrophage activation after spinal cord injury in mice. *J. Neuroinflammation*, 2012, Vol. 9, p. 40.
25. Gurtner G.C., Werner S., Barrandon Y., Longaker M.T. Wound repair and regeneration. *Nature*, 2008, Vol. 453, no. 7193, pp. 314-321.
26. Hikawa N., Horie H., Takenaka T. Macrophage-enhanced neurite regeneration of adult dorsal root ganglia neurones in culture. *Neuroreport.*, 1993, Vol. 5, no. 1, pp. 41-44.
27. Hu X., Li P., Guo Y., Wang H., Leak R.K., Chen S., Gao Y., Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics reveal novel mechanism of injury expansion after focal cerebral ischemia. *Stroke*, 2012, Vol. 43, no. 11, pp. 3063-3070.
28. Hu X., Leak R.K., Shi J., Suenaga J., Gao Y., Zheng P., Chen J. Microglial and macrophage polarization – new prospects for brain repair. *Nat. Rev. Neurol.*, 2015, Vol. 11, no. 1, pp. 56-64.
29. Jacobi A., Bareyre F.M. Regulation of axonal remodeling following spinal cord injury. *Neural Regen. Res.*, 2015, Vol. 10, no. 10, pp. 1555-1557.
30. Jiang M.H., Chung E., Chi G.F., Ahn W., Lim J.E., Hong H.S., Kim D.W., Choi H., Kim J., Son Y. Substance P induces M2-type macrophages after spinal cord injury. *Neuroreport.*, 2012, Vol. 23, no. 13, pp. 786-792.
31. Kang M., Min K., Jang J., Kim S.C., Kang M.S., Jang S.J., Lee J.Y., Kim S.H., Kim M.K., An S.A., Kim M. Involvement of immune responses in the efficacy of cord blood cell therapy for cerebral palsy. *Stem Cells Dev.*, 2015, Vol. 24, no. 19, pp. 2259-2268.
32. Kieseier B.C. The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs*, 2011, Vol. 25, no. 6, pp. 491-502.
33. Kigerl K.A., Gensel J.C., Ankeny D.P., Alexander J.K., Donnelly D.J., Popovich P.G. Identification of two distinct macrophage subsets with divergent effects causing either neurotoxicity or regeneration in the injured mouse spinal cord. *J. Neurosci.*, 2009, Vol. 29, no. 43, pp. 13435-13444.
34. Koh T.J., DiPietro L.A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.*, 2011, Vol. 13, e23.
35. Kwon M.J., Kim J., Shin H., Jeong S.R., Kang Y.M., Choi J.Y., Hwang D.H., Kim B.G. Contribution of macrophages to enhanced regenerative capacity of dorsal root ganglia sensory neurons by conditioning injury. *J. Neurosci.*, 2013, Vol. 33, no. 38, pp. 15095-15108.
36. Kwon M.J., Shin H.Y., Cui Y., Kim H., Thi A.H., Choi J.Y., Kim E.Y., Hwang D.H., Kim B.G. CCL2 Mediates neuron-macrophage interactions to drive proregenerative macrophage activation following preconditioning injury. *J. Neurosci.*, 2015, Vol. 35, no. 48, pp. 15934-15947.
37. Larochelle C., Alvarez J.I., Prat A. How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett.*, 2011, Vol. 585, no. 23, pp. 3770-3780.
38. Lech M., Anders H.-J. Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochim. Biophys. Acta*, 2013, Vol. 1832, no. 7, pp. 989-997.
39. Lee C.H., Park O.K., Yoo K.Y., Byun K., Lee B., Choi J.H., Hwang I.K., Kim Y.M., Won M.H. The role of peroxisome proliferator-activated receptor γ , and effects of its agonist, rosiglitazone, on transient cerebral ischemic damage. *J. Neurol. Sci.*, 2011, Vol. 300, no. 1-2, pp. 120-129.
40. Lo E.H. Degeneration and repair in central nervous system disease. *Nat. Med.*, 2010, Vol. 16, no. 11, pp. 1205-1209.
41. London A., Cohen M., Schwartz M. Microglia and monocyte-derived macrophages: functionally distinct populations that act in concert in CNS plasticity and repair. *Front. Cell. Neurosci.*, 2013, Vol. 7, Article 34, 10 p.

42. London A., Itskovich E., Benhar I., Kalchenko V., Mack M., Jung S. Neuroprotection and progenitor cell renewal in the injured adult murine retina requires healing monocyte-derived macrophages. *J. Exp. Med.*, 2011, Vol. 208, no. 1, pp. 23-39.
43. Lopes Pinheiro M.A., Kooij G., Mizze M.R., Kamermans A., Enzmann G., Lyck R., Schwaninger M., Engelhardt B., de Vries H.E. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. *Biochim. Biophys. Acta.*, 2016, Vol. 1862, no. 3, pp. 461-471.
44. Lu D., Sanberg P.R., Mahmood A., Li Y., Wang L., Sanchez-Ramos J., Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces neurological deficit in the rat after traumatic brain injury. *Cell. Transplant.*, 2002, Vol. 11, no. 3, pp. 275-281.
45. Lu W., Fu C., Song L., Yao Y., Zhang X., Chen Z., Li Y., Ma G., Shen C. Exposure to supernatants of macrophages that phagocytized dead mesenchymal stem cells improves hypoxic cardiomyocytes survival. *Int. J. Cardiol.*, 2013, Vol. 165, no. 2, pp. 333-340.
46. Lucas S.-M., Rothwell N.J., Gibson R.M. The role of inflammation in CNS injury and disease. *Br. J. Pharmacol.*, 2006, Vol. 147, Suppl. 1, S232-S240.
47. Lv Y.T., Zhang Y., Liu M., Qiuwaxi J.N., Ashwood P., Cho S.C., Huan Y., Ge R.C., Chen X.W., Wang Z.J., Kim B.J., Hu X. Transplantation of human cord blood mononuclear cells and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells in autism. *J. Transl. Med.*, 2013, Vol. 11, p. 196.
48. Maiorino C., Khoroshii R., Ruffini F., Løbner M., Bergami A., Garzetti L., Martino G., Owens T., Furlan R. Lentiviral-mediated administration of IL-25 in the CNS induces alternative activation of microglia. *Gene Ther.*, 2013, Vol. 20, no. 5, pp. 487-496.
49. Mandrekar-Colucci S., Sauerbeck A., Popovich P.G., McTigue D.M. PPAR agonists as therapeutics for CNS trauma and neurological diseases. *ASN Neuro*, 2013, Vol. 5, no. 5, e00129.
50. Marchetti V., Yanes O., Aguilar E., Wang M., Friedlander D., Moreno S., Storm K., Zhan M., Naccache S., Nemerow G., Siuzdak G., Friedlander M. Differential macrophage polarization promotes tissue remodeling and repair in a model of ischemic retinopathy. *Sci Rep.*, 2011, Vol. 1, p. 76.
51. Martinez F.O., Gordon S. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Rep.*, 2014, Vol. 6, p. 13.
52. Meeker R.B., Williams K., Killebrew D.A., Hudson L.C. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adhes Migr.*, 2012, Vol. 6, no. 5, pp. 390-396.
53. Meier C., Middelani J., Wasielewski B., Neuhoof S., Roth-Haerer A., Gantert M., Dinse H.R., Dermietzel R., Jensen A. Spastic paresis after perinatal brain damage in rats is reduced by human cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res.*, 2006, Vol. 59, no. 2, pp. 244-249.
54. Mikita J., Dubourdieu-Cassagno N., Deloire M.S., Vekris A., Biran M., Raffard G., Brochet B., Cannon M.H., Franconi J.M., Boiziau C., Petry K.G. Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult. Scler.*, 2011, Vol. 17, no. 1, pp. 2-15.
55. Mildner A., Mack M., Schmidt H., Bruck W., Djukic M., Zabel M.D., Hille A., Priller J., Prinz M. CCR2+Ly-6Chi monocytes are crucial for the effector phase of autoimmunity in the central nervous system. *Brain*, 2009, Vol. 132, pp. 2487-2500.
56. Min K., Song J., Kang J.Y., Ko J., Ryu J.S., Kang M.S., Jang S.J., Kim S.H., Oh D., Kim M.K., Kim S.S., Kim M. Umbilical cord blood therapy potentiated with erythropoietin for children with cerebral palsy: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Stem Cells*, 2013, Vol. 31, no. 3, pp. 581-591.
57. Miron V.E., Boyd A., Zhao J.W., Yuen T.J., Ruckh J.M., Shadrach J.L., van Wijngaarden P., Wagers A.J., Williams A., Franklin R.J. M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.*, 2013, Vol. 16, no. 9, pp. 1211-1218.
58. Moehle M.S., West A.B. M1 and M2 immune activation in Parkinson's Disease: Foe and ally? *Neuroscience*, 2015, Vol. 302, pp. 59-73.
59. Mosser D.M., Edwards J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.*, 2008, Vol. 8, no. 12, pp. 958-969.
60. Narantuya D., Nagai A., Sheikh A.M., Masuda J., Kobayashi S., Yamaguchi S., Kim S.U. Human microglia transplanted in rat focal ischemia brain induce neuroprotection and behavioral improvement. *PLoS One*, 2010, Vol. 5, no. 7, e11746.
61. Pimentel-Coelho P.M., Magalhaes E.S., Lopes L.M., de Azevedo L.C., Santiago M.F., Mendez-Otero R. Human cord blood transplantation in a neonatal rat model of hypoxic-ischemic brain damage: functional outcome related to neuroprotection in the striatum. *Stem Cells Dev.*, 2010, Vol. 19, no. 3, pp. 351-358.
62. Prinz M., Priller J. Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nat. Rev. Neurosci.*, 2014, Vol. 15, no. 5, pp. 300-312.

63. Protti A., Mongue-Din H., Mylonas K.J., Sirker A., Sag C.M., Swim M.M., Maier L., Sawyer G., Dong X., Botnar R., Salisbury J., Gray J.A., Shah A.M. Bone marrow transplantation modulates tissue macrophage phenotype and enhances cardiac recovery after subsequent acute myocardial infarction. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2016, Vol. 90, pp. 120-128.
64. Rapalino O., Lazarov-Spiegler O., Agranov E., Velan G.J., Yoles E., Fraidakis M., Solomon A., Gepstein R., Katz A., Belkin M., Hadani M., Schwartz M. Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat. Med.*, 1998, Vol. 4, no. 7, pp. 814-821.
65. Rawji K.S., Yong V.W. The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, Article 948976, 13 p.
66. Rawji K.S., Mishra M.K., Yong V.W. Regenerative capacity of macrophages for remyelination. *Front Cell Dev. Biol.*, 2016, Vol. 4, p. 47.
67. Rocher C., Singla D.K. SMAD-PI3K-Akt-mTOR pathway mediates BMP-7 polarization of monocytes into M2 macrophages. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 12, e84009.
68. Rolls A. Two faces of chondroitin sulfate proteoglycan in spinal cord repair: a role in microglia/macrophage activation. *PLoS Med.*, 2008, Vol. 5, no. 8, e171.
69. Sakhno L.V., Shevela E.Y., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. The phenotypic and functional features of human M2 macrophages generated under low serum conditions. *Scand. J. Immunol.*, 2016, Vol. 83, no. 2, pp. 151-159.
70. Sanberg P.R., Park D-H., Kuzmin-Nichols N., Cruz E., Hossne N.A. Jr, Buffolo E., Willing A.E. Monocyte transplantation for neural and cardiovascular ischemia repair. *J. Cell. Mol. Med.*, 2010, Vol. 14, no. 3, pp. 553-563.
71. Shahaduzzaman M.D., Mehta V., Golden J.E., Rowe D.D., Green S., Tadinada R., Foran E.A., Sanberg P.R., Pennypacker R.R., Willing A.E. Human umbilical cord blood cells induce neuroprotective change in gene expression profile in neurons after ischemia through activation of Akt pathway. *Cell. Transplant.*, 2015, Vol. 24, no. 4, pp. 721-735.
72. Shechter R., London A., Schwartz M. Orchestrated leukocyte recruitment to immune-privileged sites: absolute barriers versus educational gates. *Nat. Rev. Immunol.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 206-218.
73. Shechter R., London A., Varol C., Raposo C., Cusimano M., Yovel G., Rolls A., Mack M., Pluchino S., Martino G., Jung S., Schwartz M. Infiltrating blood-derived macrophages are vital cells playing an anti-inflammatory role in recovery from spinal cord injury in mice. *PLoS Med.*, 2009, Vol. 6, no. 7, e1000113.
74. Shechter R., Miller O., Yovel G., Rosenzweig N., London A., Ruckh J., Kim K.W., Klein E., Kalchenko V., Bendel P., Lira S.A., Jung S., Schwartz M. Recruitment of beneficial M2 macrophages to injured spinal cord is orchestrated by remote brain choroid plexus. *Immunity*, 2013, Vol. 38, no. 3, pp. 555-569.
75. Shechter R., Schwartz M. Harnessing monocyte-derived macrophages to control central nervous system pathologies: no longer 'if' but 'how'. *J. Pathol.*, 2013, Vol. 229, pp. 332-346.
76. Simard A.R., Soulet D., Gowing G., Julien J.P., Rivest S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 2006, Vol. 49, no. 4, pp. 489-502.
77. Starossom S.C., Mascanfroni I.D., Imitola J., Cao L., Raddassi K., Hernandez S.F., Bassil R., Croci D.O., Cerliani J.P., Delacour D., Wang Y., Elyaman W., Khoury S.J., Rabinovich G.A. Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration. *Immunity*, 2012, Vol. 37, no. 2, pp. 249-263.
78. Stefater J.A., Ren S., Lang R.A., Duffield J.S. Metchnikoff's policemen: macrophages in development, homeostasis and regeneration. *Trends Mol. Med.*, 2011, Vol. 17, no. 12, pp. 743-752.
79. Thored P., Heldmann U., Gomes-Leal W., Gisler R., Darsalia V., Taneera J., Nygren J.M., Jacobsen S.E., Ekdahl C.T., Kokaia Z., Lindvall O. Long-term accumulation of microglia with proneurogenic phenotype concomitant with persistent neurogenesis in adult subventricular zone after stroke. *Glia*, 2009, Vol. 57, no. 8, pp. 835-849.
80. Vendrame M., Gemma C., de Mesquita D., Collier L., Bickford P.C., Sanberg C.D., Sanberg P.R., Pennypacker K.R., Willing A.E. Anti-inflammatory effects of human cord blood cells in a rat model of stroke. *Stem Cells Dev.*, 2005, Vol. 14, no. 5, pp. 595-604.
81. Verma S., Nakaoka R., Dohgu S., Banks W.A. Release of cytokines by brain endothelial cells: A polarized response to lipopolysaccharide. *Brain Behav. Immun.*, 2006, Vol. 20, no. 5, pp. 449-455.
82. Walker P.A., Shah S.K., Jimenez F., Aroom K.R., Harting M.T., Cox C.S. Jr. Bone marrow-derived stromal cell therapy for traumatic brain injury is neuroprotective via stimulation of non-neurologic organ systems. *Surgery*, 2012, Vol. 152, no. 5, pp. 790-793.
83. Wang G., Zhang J., Hu X., Zhang L., Mao L., Jiang X., Chen J. Microglia/macrophage polarization dynamics in white matter after traumatic brain injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab.*, 2013, Vol. 33, no. 12, pp. 1864-1874.
84. Wang X., Cao K., Sun X., Chen Y., Duan Z., Sun L., Guo L., Bai P., Sun D., Fan J., He X., Young W., Ren Y. Macrophages in spinal cord injury: phenotypic and functional change from exposure to myelin debris. *Glia*, 2015, Vol. 63, no. 4, pp. 635-651.

85. Womble T.A., S. Green M., Shahaduzzaman J., Grieco P.R., Sanberg K.R., Pennypacker A.E., Willing A.E. Monocytes are essential for the neuroprotective effect of human cord blood cells following middle cerebral artery occlusion in rat. *Mol. Cell. Neurosci.*, 2014, Vol. 59, pp. 76-84.
86. Wynn T.A., Vannella K.M. Macrophages in tissue repair, regeneration, and fibrosis. *Immunity*, 2016, Vol. 44, no. 3, pp. 450-462.
87. Xiong X.Y., Liu L., Yang Q.W. Functions and mechanisms of microglia/macrophages in neuroinflammation and neurogenesis after stroke. *Prog. Neurobiol.*, 2016, Vol. 142, pp. 23-44.
88. Yang J., Ding S., Huang W., Hu J., Huang S., Zhang Y., Zhuge Q. Interleukin-4 ameliorates the functional recovery of intracerebral hemorrhage through the alternative activation of microglia/macrophage. *Front Neurosci.*, 2016, Vol. 10, p. 61.
89. Yin Y., Henzl M.T., Lorber B., Nakazawa T., Thomas T.T., Jiang F., Langer R., Benowitz L.I. Oncomodulin is a macrophage-derived signal for axon regeneration in retinal ganglion cells. *Nat. Neurosci.*, 2006, Vol. 9, no. 6, pp. 843-852.
90. Zhu W., Fan Y., Frenzel T., Gasmi M., Bartus R. T., Young W. L., Chen, Y. Insulin growth factor-1 gene transfer enhances neurovascular remodeling and improves long-term stroke outcome in mice. *Stroke*, 2008, Vol. 39, no. 4, pp. 1254-1261.

Авторы:

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

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

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

Authors:

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

Shevela E.Ya., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cellular Immunotherapy, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

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

Поступила 30.08.2016
Принята к печати 01.09.2016

Received 30.08.2016
Accepted 01.09.2016

ОСОБЕННОСТИ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ НК-КЛЕТОК: CD56^{dim} И CD56^{bright} НК-КЛЕТКИ ВО ВРЕМЯ И ВНЕ БЕРЕМЕННОСТИ

Михайлова В.А.^{1,2}, Белякова К.Л.¹, Сельков С.А.¹, Соколов Д.И.^{1,2,3}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

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

Резюме. НК-клетки представляют собой лимфоциты, способные к контактному цитолизу вирус-инфицированных клеток и опухолевых клеток и являющиеся источником цитокинов, стимулирующих другие клетки иммунной системы и способствующих развитию иммунного ответа. Дифференцировка НК-клеток связана с последовательным приобретением стволовыми клетками специфических для НК-клеток рецепторов и становлением функциональных характеристик натуральных киллеров. Целью настоящего обзора было рассмотрение CD56^{dim} и CD56^{bright} популяций НК-клеток в процессе их дифференцировки. В обзоре описаны поверхностные рецепторы НК-клеток и экспрессия ими транскрипционных факторов на разных стадиях дифференцировки, представлена сравнительная характеристика данных о влиянии цитокинов и клеток микроокружения на процесс дифференцировки НК-клеток, рассмотрено явление существования НК-клеток, подобных клеткам памяти. Особый интерес представляет дифференцировка НК-клеток матки, так как эти клетки являются особой популяцией НК-клеток, которая преобладает среди лимфоцитов децидуальной оболочки при беременности и принимает участие в процессе образования и ремоделирования плаценты. В обзоре рассмотрены особенности дифференцировки НК-клеток матки, учитывая возможность образования этой популяции НК-клеток как из НК-клеток периферической крови, так и пролиферации *in situ*. Изучение особенностей функционального состояния НК-клеток матки позволит в дальнейшем приблизиться к пониманию роли НК-клеток при беременности и нарушению оказываемой НК-клетками регуляции в зоне маточно-плацентарного контакта при патологии беременности.

Ключевые слова: НК-клетки, дифференцировка, беременность, поверхностные рецепторы, цитокины, НК-клетки матки, децидуальные НК-клетки

PECULIARITIES OF NK CELLS DIFFERENTIATION: CD56^{dim} AND CD56^{bright} NK CELLS AT PREGNANCY AND IN NON-PREGNANT STATE

Mikhailova V.A.^{a,b}, Belyakova K.L.^a, Selkov S.A.^a, Sokolov D.I.^{a,b,c}

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

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

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

Abstract. Natural killer (NK) cells represent a lymphocyte subpopulation which is capable of contact cytolysis of virus-infected cells and tumor cells, being a source of cytokines which stimulate other immune

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

В.А. Михайлова, К.Л. Белякова, С.А. Сельков, Д.И. Соколов
«Особенности дифференцировки НК-клеток: CD56^{dim} и CD56^{bright} НК-клетки во время и вне беременности»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 19-26.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-19-26

For citation:

V.A. Mikhailova, K.L. Belyakova, S.A. Selkov, D.I. Sokolov
“Peculiarities of NK cells differentiation: CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells at pregnancy and in non-pregnant state”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 19-26.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-19-26

© Михайлова В.А. и соавт., 2017

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-19-26>

cells and promote immune response. NK cell differentiation is connected with a consequent acquisition of specific NK cell receptors by stem cells and formation of functional characteristics inherent to natural killer cells. The aim of this review was to describe the CD56^{dim} and CD56^{bright} populations of NK cells in the course of their differentiation. The authors describe NK surface receptors and expression of transcription factors at various steps of the NK differentiation. We present comparative characteristics of data concerning cytokines and cellular microenvironment influence upon NK cell differentiation, and examine a phenomenon of existing memory-like NK cells. Uterine NK cell differentiation is of special interest, since these cells represent a special NK cell population which prevails among decidual lymphocytes during pregnancy and participates in the process of placental formation and development. This review considers some features of uterine NK cell differentiation, taking into account a possibility of formation of this NK cell population from both peripheral blood NK pool, and *in situ* proliferation. Moreover, functional studies of the uterine NK cells allow to get closer to understanding the role of NK cells during pregnancy and abnormality of utero-placental bed regulation by NK cells in cases of pregnancy failure.

Keywords: NK cells, differentiation, pregnancy, cell surface receptors, cytokines, uterine NK cells, decidual NK cells

Introduction

Natural killer (NK) are a part of innate immunity system and represent lymphocytes, which are capable of contact cytolysis of virus infected cells and tumor cells and are the source of cytokines stimulating other cells of the immune system and promoting immune response development [3]. NK cells in humans are present naturally in most organs and tissues, including bone marrow, thymus, lymph nodes, blood, skin, intestines, liver, lungs, uterus [6, 37]. NK cells are often addressed as CD3⁺CD56⁺ lymphocytes although the expression pattern of NK cells includes variety of receptors including killer immunoglobulin-like receptors (KIR) [38], CD16 (Fcγ-receptor III), which mediates antibody-dependent cellular cytotoxicity [25, 32], natural killer group (NKG) receptors, cytotoxic receptors NKp30, NKp44, NKp46 [20]. NK cells differentiation and development is connected with the consequent change of repertoire of receptors present in the cell and their acquisition of functional properties. Studying different aspects of NK cell differentiation in humans especially during pregnancy is of special interest, because NK cells functional and phenotypic specifics are closely connected with healthy pregnancy.

1. Development of NK cells main populations

1.1. NK cells populations' development in fetus

Mainly NK cells are present in tissues as intraepithelial lymphocytes, however, NK cells can also form cell clusters, such as in Peyer's glands and mesenterial lymph nodes [6]. In peripheral blood, mature NK cells are characterized by broad spectrum expression of KIR, having both activation and inhibitory activity [2]. NK cell differentiation and their expression of KIR begin at early stages of fetus development [14]. Mainly, NK cells locate in such fetus organs as liver and lungs, also NK cells are present in fetal spleen. Less NK cells are found in bone marrow and mesenterial lymph nodes [14]. Fetus NK cells are characterized by phenotype

CD7⁺CD161⁺CD3⁺CD14⁺CD19⁺CD45⁺, and also by high expression of CD56 [19], as the result of which it seems to be impossible to divide fetus NK cell populations into CD56^{dim} and CD56^{bright} cells¹ as in adults [14]. NK cell differentiation in fetus is evaluated by level of NKG2A and CD16 receptors expression. It has been demonstrated that the ratio of NK cell populations NKG2A⁺CD16⁻ (that can be corresponded to CD56^{bright} population in adults), NKG2A⁺CD16⁺ and NKG2A⁻CD16⁺ (that can be corresponded to CD56^{dim} population in adults) does not change at the gestational age from 15 weeks to 22 weeks, which indicates that NK cell differentiation takes place before the 15th week of pregnancy [14]. The character of KIR receptor expression by fetus NK cells varies depending on cell localization: the highest expression of KIR is found in NK cells, localized in fetus lungs. Like in adult organisms, an expression of large repertoire of KIR is connected with NK cell differentiation: the highest density of KIR is typical for NK cell populations NKG2A⁺CD16⁺ and NKG2A⁻CD16⁺. The expression of CD57, which is a marker of terminal stages of NK cell differentiation, is set for NKG2A⁻CD16⁺ [14], which indicates higher maturity level of these cells.

Comparing fetal NK cells and peripheral blood NK cells in an adult person, it was stated that NK cells of both groups can induce death of cells, which were not expressing MHC-1 locus molecules. However, compared to adult NK cells, fetal NK cells are characterized by lower cytotoxic activity [14, 19], but higher ability to respond to cytokine stimulation (IL-12, IL-18) [14]. Fetal NK cells localized in lungs contain perforin and granzyme B, while perforin and granzyme B content increases as NK cells differentiate from NKG2A⁺CD16⁻ in NKG2A⁻CD16⁺, which indicates maturation of functional apparatus of fetal NK cells during differentiation [14].

¹ dim – low expression of receptor; bright – high expression of receptor

1.2. NK cells populations' development in adults

1.2.1. Characteristics of two main populations of NK cells (CD56^{bright} and CD56^{dim})

In adult organisms, the main source of hematopoietic stem cells, which can differentiate in NK cells, is bone marrow [2, 20]. NK cells can circulate [6] and continue their differentiation in spleen, tonsils and lymph nodes [20]. In secondary lymphoid tissue, NK cell progenitors pass differentiation to the stage of immature NK cells [20], which, in turn, develop into NK cells with phenotype CD56^{dim}CD16^{bright}, prevailing in blood flow, and CD56^{bright}CD16^{dim} NK cells, placed in liver, endometrium, decidua and lymph nodes [3]. Recently CD56^{bright}CD16^{dim} NK cells are viewed as precursors of CD56^{dim}CD16^{bright} NK cells [37]. While differentiation NK cells acquire functional receptors, connected with their cytotoxic function. In the beginning an expression of CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D receptors is observed, and then an expression of KIR and CD16 receptors [37].

CD56^{dim}CD16^{bright} NK cells, present in peripheral blood and spleen, are characterized by increased cytotoxic activity and expression of broad spectrum of KIR, as well as cytotoxic receptors NKp30, NKp44, NKp46 [20]. While culturing of CD56^{dim}CD16^{bright} NK cells with K562 cells, an increase of IFN γ , TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β production by NK cells was demonstrated [9].

The CD56^{bright}CD16^{dim} population of NK cells is mainly present in lymph nodes and tonsils, and in blood, it makes up less than 10% of NK cell population [20]. For CD56^{bright}CD16^{dim} NK cells, reduced cytotoxic activity and reduced expression of NKp46 receptors is typical [20]. In presence of K562 the CD56^{bright}CD16^{dim} population of NK cells does not significantly change cytokine production, however, with combined stimulation by IL-12 and IL-18 cytokines, it demonstrates an increased production of IFN γ compared to CD56^{dim}CD16^{bright} NK cells [9]. Often the CD56^{bright}CD16^{dim} population of NK cells is

combined with CD56^{bright}CD16⁻ NK cells, indicating the general population CD56^{bright}CD16^{-/dim}, and noting that the defining marker of these populations is CD56, while CD16 does not mediate the main functional properties of these cells [6, 20, 35]. As the result of activation both *in vivo* (after entering lymph node with afferent lymph) and *in vitro* NK cells with CD56^{bright}CD16^{dim} phenotype can acquire an increased content of perforin and a phenotype of CD56^{dim}CD16^{bright} NK cells: KIR⁺ IL-7R⁻ c-kit (CD117⁻) CXCR3-CCR7-CD62L⁻ [6]. Table 1 shows information about the surface receptor expression by NK-cells at different stages of differentiation.

1.2.2. Transcription factors in NK cells development process

Differentiation of NK cell is characterized by expression of a certain set of transcription factors. Using the analysis of expressed mRNA in the *in vitro* model of human NK cells differentiation obtained from umbilical vein, it was determined that at the stage of transfer from stem cells to NK cell progenitors, E4BP4 and TOX transcription factors participate [28]. While differentiation of NK cell progenitors into mature NK cells an expression of the transcription factors Ikaros, EGF1 and PU.1 is observed [28]. There is a high expression of transcription factors EGR-2, ID-2, and T-bet at all stages of NK cell differentiation. An expression of Gata-3 transcription factor in NK cell progenitors decreases for the short time and then restores to the initial level. High expression of EGR-2, ID-2, T-bet, and Gata-3 factors is connected with their participation in all stages of NK cell differentiation and in acquisition of functional properties by NK cells [28]. Transcription factor IRF-2, apparently, participates in maintenance of differentiated NK cell pool, because a defect of this protein results in an increase of intensity of NK cell apoptosis [28]. It was also demonstrated *in vitro* that, as the result of IL-12 impact on mature NK cells, an expression of transcription factor ID3 mRNA

TABLE 1. SURFACE RECEPTORS OF HUMAN NK-CELLS DEFINING THE STAGES OF THEIR DIFFERENTIATION

Differentiation stage	Localization	Surface receptors
Hematopoietic stem cell	Bone marrow [2, 20]	CD34 ⁺ CD38 ^{dim} CD45RA ⁺ CD10 ⁻ [37]
Stage 1	Bone marrow [2, 20]	CD34 ⁺ CD117 ⁻ CD94 ⁺ CD16 ⁻ CD45RA ⁺ CD10 ⁺ [20, 37]
Stage 2	Secondary lymphoid tissue [20]	CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD94 ⁺ CD16 ⁻ CD45RA ⁺ CD10 ⁻ CD161 ⁺ Integrin β 7 ^{bright} [10, 20, 37]
Stage 3	Secondary lymphoid tissue [20]	CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD94 ⁺ CD16 ⁻ CD11a ⁺ CD161 ⁺ NKp44 ⁺ CD56 ⁻ [13, 10, 37]
Stage 4 CD56 ^{bright}	Liver, uterine endometrium, decidua, lymph nodes [3, 20]	CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD94 ⁺ CD16 ^{-/dim} CD11a ⁺ CD56 ^{bright} NKp46 ^{dim} [3, 20, 37]
Stage 5 CD56 ^{dim}	Peripheral blood, spleen [3, 20]	CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD94 ⁺ CD16 ^{+/bright} KIR ^{+/+} CD56 ^{dim} NKp30 ⁺ NKp44 ⁺ NKp46 ⁺ CXCR3-CCR7-CD62L ⁻ [3, 6, 20, 37]
Stage 6 (Memory cell)	Peripheral blood [30]	NKG2A ⁺ CD94 ⁺ NKp46 ⁺ CD69 ⁺ [30]

increases, while an expression of Gata3 and TOX reduces [18].

1.2.3. Non-linear character of NK cells populations' development

Despite the attempts to determine a sequence of NK cell developmental stages, current data on nonlinear character of NK cell differentiation appear in literature, in particular, depending on their localization and microenvironment. In the experiments on mice, transformed by human plasmids of cytokines IL-15 and Flt-3L, it was demonstrated that from common progenitor of myeloid cells, for which CD56^{dim}CD36⁺CD33⁺CD34⁺NKG2D⁺NKp46⁻ phenotype is typical, myeloid progenitors of NK cells with CD56^{dim}CD36⁺CD33⁺CD34⁺NKG2D⁺NKp46⁻ phenotype are differentiated. Then, these progenitors of NK cells acquire a phenotype of CD56^{bright}CD36⁻CD33⁻CD34⁺NKG2D⁺NKp46⁺ NK cells [7]. The investigation also determined presence of myeloid progenitors of NK cells in humans in umbilical vein blood, as well as in fetal bone marrow and in bone marrow of an adult human [7]. Furthermore, it described presence of special populations of NK cell progenitors with DX5⁺CD49a⁺ phenotype, which were formed in the liver from CD45.1⁺NK1.1⁻CD3⁻CD19⁻ NK cells of the spleen and were not detected in bone marrow [26].

1.2.4. Phenomenon of "memory-like NK cells"

Currently, a possibility of existence of memory-like NK cells, which may be formed both by CD56^{bright} and CD56^{dim} NK cells [30] and be a final stage of NK cell differentiation, is discussed in literature [37]. The term memory-like NK cells, which means NK cells similar to memory cells, is used in literature. Some scientists point out three possible variants of memory-like NK cells, which differ by mechanism of formation and functional characteristics: virus dependent induction, cytokine induction, and existence of specialized population of memory-like NK cells in liver [24]. A capacity of NK cells, previously activated by IL-12 and IL-18 cytokines, after a certain period of time (from 7 to 21 days) at repeated cytokine stimulation to produce an increased number of IFN γ compared to control was described [30]. At the same time, NK cell cytotoxicity evaluated by CD107a does not differ between the so-called memory NK cells and intact NK cells [30]. As NK cells have no antigen-induced differentiation, the term "memory NK cells" seems to be incorrect. Based on hypothetical mechanisms of memory-like NK cell induction, the most correct term seems to be "pre-activated NK cells". Currently, no markers unique to pre-activated NK cells were detected, however, a correlation between capacity to produce IFN γ by pre-activated CD56^{bright} NK cells and expression of NKG2A/CD94 receptor is determined, as well as correlation between capacity

to produce IFN γ by pre-activated NK cells of both populations (CD56^{bright} and CD56^{dim}) and expression of NKp46 receptor [30]. It should be noted that the population of pre-activated CD56^{bright} NK cells secrete more IFN γ than CD56^{dim} NK cells after repeated stimulation both by cytokines and cells of leukemia cell line K562 [30]. These factors indicate alteration of functional properties of NK cells as the result of preliminary activation by cytokines and preservation of these alterations during a few days. There are evidences of pre-activation of NK cells not only *in vitro*, but also *in vivo*: in humans an adaptive change of NK cells properties induced by cytomegalovirus (CMV) infection occurs, it implies change in cytokine secretion and activating receptor NKG2C expression [29]. The mechanisms determining a phenomenon of pre-activation for NK cells are poorly known. Currently it is shown that pre-activated NK cells do not differ from intact NK cells by their content of phosphorylated forms of proteins STAT4 and STAT3, as well as by their content of IFN γ mRNA, which indicates the presence of post-transcriptional and post-translational mechanisms of memory induction at NK cells [30].

Thus, NK cell differentiation process in humans is connected with activation of transcriptional factors E4BP4, TOX, Ikaros, EGF1, PU.1, EGR-2, ID-2, IRF-2, T-bet, Gata-3 [28], and consequential change of repertoire of cell surface receptors, particularly acquirement of receptors CD56, CD94/NKG2A, NKp46, NKG2D, NKp30, NKp44, receptors KIR, CD16 [14, 20, 28]. Currently, two main populations of human NK cells are distinguished: CD56^{dim}CD16^{bright} and CD56^{bright}CD16^{dim} [3]. They are also supposed to represent two consequent stages of NK cell differentiation and their possible transfer from CD56^{bright}CD16^{dim} to CD56^{dim}CD16^{bright} cells [37]. Generally, the role of NK cells is realized in elimination virus-infected and tumor cells from organism, however, at such physiological state as pregnancy NK cells actively participate in the process of blastocyst implantation and placenta development. Despite investigations conducted of NK cell participation in pregnancy development, peculiarities of NK cell differentiation in placenta are poorly described.

2. Phenotype and functions of uterine NK cells at pregnancy

2.1. Presence of NK cells in uterus

NK cells make up a special population of uterine cells that significantly changes their representation in uterus depending on menstrual cycle phase and pregnancy. According to some data, decidual NK cells and endometrium NK cells differ little by phenotypic characteristics [22]. For endometrium NK cells an expression of activation receptors NKp46 and NKG2D

and lack or low expression of CD16, NKp44, NKp30 is typical while for decidual NK cells an expression of NKp46, NKG2D, NKp30, NKp44 is typical [23]. At pregnancy an IL-15 secretion by placenta is set [4], in presence of which activation of endometrial NK cells, their secretion of IFN γ and IP-10, higher expression of NKp46, NKp30, NKp44, NKG2D take place [23]. Thus, endometrial NK cells at pregnancy can change their phenotype and start a population of decidual cells. Then, during the first trimester, an increase of uterine NK cell numbers takes place, which make up from 50% to 90% of lymphoid cells, present in uterus [11]. Such alteration of NK cell number in the zone of uteroplacental bed may be due to migration of NK cells from peripheral blood [2, 27] through expressing receptors to chemokines produced by cells of decidua [1].

2.2. Peculiarities of uterine NK cell differentiation at pregnancy

According to literature data, the final stages of NK cell differentiation represent transfer from CD56^{bright} to CD56^{dim} phenotype [37]. Apparently, this process has a reversible nature, as decidua NK cells differ from CD56^{bright} NK cells of peripheral blood by expression of inhibiting receptors, for which CD56^{bright} CD16^{dim/-} phenotype, CD94 expression, and high content of cytolytic granules are typical [6, 20]. Also as opposed to NK cells of peripheral blood decidual NK cells to a far greater extent can bind HLA-G, expressed at trophoblast cells [34]. Probably, as the result of influence of cytokines, secreted in the zone of uteroplacental bed, alteration of CD56^{dim} phenotype of NK cells of peripheral blood and their acquisition of CD56^{bright} phenotype of decidual NK cells [2]. Such alteration of NK cell phenotype in placenta at pregnancy is a continuation of NK cell differentiation *in situ*.

2.2.1. Oxygen supply modifiers NK cells differentiation at pregnancy

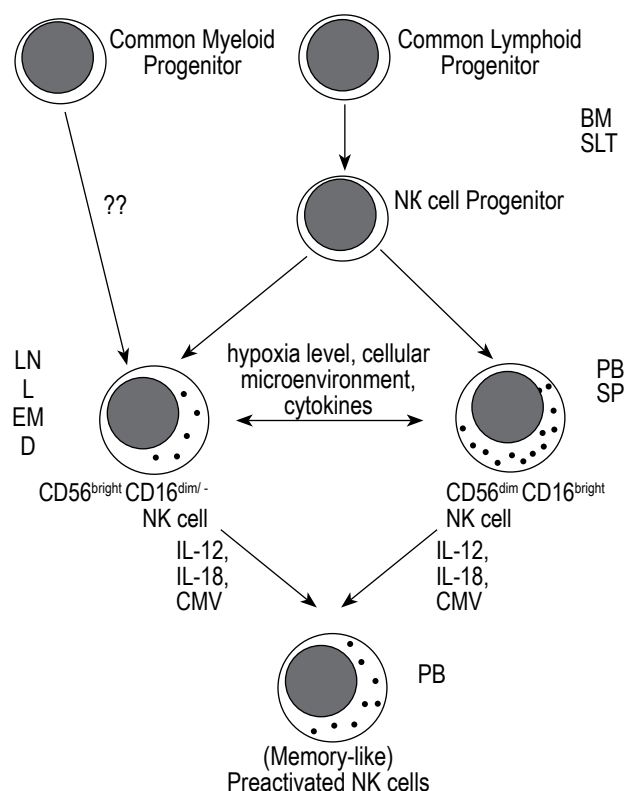
Significant influence on differentiation of NK cells of peripheral blood into decidua NK cells is exerted by modifying oxygen supply to tissue. At early gestational age after blastocyst invasion, but before rearrangement of spiral arteries, the cells, present in fetal-placental complex, are in hypoxic conditions [15]. During the first trimester, the oxygen partial pressure in fetal-placental complex makes up about 20 mm of mercury (2%) and increases to about 60 mm of mercury (10%) through the 12th week of pregnancy. In decidua oxygen, partial pressure at the beginning of pregnancy constitutes 50 mm of mercury (8%) and in the end of the first trimester it increases up to 70 mm of mercury (12%), in proximity of spiral arteries it reaches 90-100 mm of mercury (20%) [36]. In the experiments with NK cells obtained *in vitro* from human hematopoietic stem cells, it was detected that in hypoxic conditions (1% O₂) NK cells decrease expression of NKp30 and NKG2D activation markers

[38]. At 10% O₂ decidual NK cells restore expression of NKG2D receptor, and at 21% O₂ decidual NK cells reduce CD56 expression compared to culturing conditions at 10% O₂ [36]. At combined culturing of trophoblast cells line (SGHPL-4) and decidual NK cells with 10% O₂, the higher invasive activity of trophoblast and higher trophoblast capacity to form capillary-like structures is determined [36], which reflects the situation *in vivo*, when in the end of first trimester trophoblast invasion into uterus spiral arteries and establishment of uteroplacental blood supply takes place [16]. Thus, decidual cells, being in dynamic hypoxic conditions in placenta, can change their phenotype, reducing expression of receptors mediating cytotoxicity, and provide for regulation of uteroplacental bed development.

2.2.2. Cellular and cytokine microenvironment influences NK cells differentiation at pregnancy

Differentiation of NK cells of peripheral blood into decidua NK cells is influenced by cellular and cytokine microenvironment. Thus, combined culturing of NK cells of peripheral blood with decidual stromal cells results in reduction of NKp44, NKp30, NKG2D, DNAM-1 expression by NK cells of peripheral blood [8] and approaching of NK cell phenotype to the phenotype typical for decidual NK cells. Furthermore, binding of chemokine CXCL12 (SDF-1), secreted by placenta cells, leads to reduction of expression of NKp44, perforin by NK cells of peripheral blood, decrease of cytotoxicity, increase of expression of inhibiting receptor KIR2DL1 [27]. In the experiments *in vitro*, the TGF- β secreted by decidual cells causes reduction of CD16 expression by NK cells of peripheral blood, approximating their phenotype to decidual NK cells [5, 17]. Probably, decidual NK cells can maintain their differentiation due to autocrine impact of cytokine TGF- β , because, according to literature data, during pregnancy the number of decidual NK cells, characterized by capacity to secrete TGF- β , increases [31].

At the same time, probably, not all NK cells of peripheral blood can migrate into the uterus and change their phenotype. It was demonstrated that among decidual cells compared to NK cells of peripheral blood many more cells expressed receptor CD25 [33]. At that, more than half of cells present in decidua and expressing CD25 are NK cells, while in peripheral blood, T-lymphocytes make up the majority of CD25⁺ cells [33]. For NK cells of peripheral blood with CD3-CD56^{bright}CD25⁺ phenotype the reduced expression of inhibiting receptors and increased expression of activation receptors is typical, as well as reduced content of perforin and granzyme B and increased expression of IFN γ and TGF- β [33]. It is supposed that these NK cells can migrate into the uterus and their main function is to secrete cytokines and maintain cytokine microenvironment in the zone of uteroplacental bed at pregnancy [33]. However, at



BM – bone marrow; SLT – secondary lymphoid tissue; PB – peripheral blood; SP – spleen; LN – lymph nodes; L – liver; EM – endometrium; D – decidua; CMV – cytomegalovirus

Figure 1. Peculiarities of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells differentiation

incubation of CD25⁺ NK cells with trophoblast, NK cells increased expression of NKp30, NKp44, NKp46 receptors [33], which indicates induction of CD25⁺ NK cell activation by trophoblast.

In uterus mucous membrane, the presence of NK cell progenitors at the intermediate stage of differentiation was determined, while no NK cell progenitors at early stages of differentiation were found [21]. Uterus NK cell progenitors at the intermediate stage have phenotype CD45⁺CD3⁺CD19⁺CD117⁺CD94⁺CD7^{+/+}CD69⁺CD122^{dim}CD127^{+/+}NKp44^{+/+}NKG2D⁻ [21], which makes them similar to NK cell progenitors at the intermediate stage present in secondary lymphoid tissue [10, 13, 37]. Furthermore, NK cell progenitors at the intermediate stage in uterus [21], like in secondary lymphoid tissue [12], can secrete IL-22, which indicates the occurrence of NK cell differentiation process in uterus not only from

NK cells of peripheral blood after migration, but also from NK cell progenitors placed in uterus.

Thus, uterine NK cells represent the terminal stage of NK cell differentiation, which resemble the stage of CD56^{bright} NK cell differentiation. For uterine NK cells expression of CD56, NKp46, NKG2D, NKp30, NKp44, secretion of IFN γ and TGF- β is typical. Without pregnancy, endometrial NK cells are present in the uterus; following pregnancy endometrial NK cells change their phenotype and differentiate into decidual NK cells. Significant growth of decidual NK cell numbers at pregnancy takes place through migration of NK cells from peripheral blood and respective alteration of their phenotype although differentiation of uterine NK cells can also occur *in situ*. Figure 1 shows paths of differentiation of CD56^{dim} and CD56^{bright} NK cells.

Conclusion

Currently, there is a great deal of evidence on phenotypic peculiarities of NK cells, which can determine functional features of different populations of NK cells. Summarizing these phenotypical and functional characteristics of NK cells populations can help in further distinguishing stages of NK cells differentiation process. Determining NK cell differentiation markers and examining peculiarities of NK cell functional characteristics promoted discovering NK cell capacity for pre-activation and retention of this condition during a long period of time. Further investigation of so-called pre-activated NK cells, or memory-like NK cells, may contribute in understanding of fundamental immunologic processes. Appearance of data about possible non-linear nature of NK cell differentiation, as well as about influence of microenvironment cells on NK cell differentiation process, indicates the necessity of further investigations in this direction. Examining expression patterns of NK cell receptors at pregnancy is of special interest, as in this case, discovering reversibility of NK cell differentiation at the final stages of this process is possible, as well as the dependence of uterus NK cell functional peculiarities from the repertoire of expressed receptors. Further study and analysis of peculiarities of the NK cell functional state will allow us to come close to understanding the NK cell role at pregnancy and disorder of NK cell regulation in the zone of uteroplacental bed at pathologic pregnancy.

Список литературы / References

1. Михайлова В.А., Онохина Я.С., Сельков С.А., Соколов Д.И. Экспрессия адгезионных молекул и хемокиновых рецепторов NK-клетками периферической крови при беременности // Иммунология, 2011. Т. 32, № 2. С. 78-81. [Mikhailova V.A., Onokhina Ya.S., Selkov S.A., Sokolov D.I. Expression of adhesion molecules and chemokine receptors by peripheral blood NK-cells in pregnancy. *Immunologiya = Immunology*, 2011, Vol. 32, no. 2, pp. 78-81. (In Russ.)]
2. Михайлова В.А., Сельков С.А., Соколов Д.И. Фенотипические и функциональные характеристики NK-клеток при беременности // Акушерство и гинекология, 2011. № 5. С.4-9. [Mikhailova V.A., Selkov S.A.,

Sokolov D.I. Phenotypical and functional characteristics of NK cells in pregnancy. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2011, no. 5, pp. 4-9. (In Russ.)

3. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media. 752 p.

4. Agarwal R., Loganath A., Roy A.C., Wong Y.C., Ng S.C. Expression profiles of interleukin-15 in early and late gestational human placenta and in pre-eclamptic placenta. *Mol. Hum. Reprod.*, 2001, Vol. 7, no. 1, pp. 97-101.

5. Allan D.S., Rybalov B., Awong G., Zuniga-Pflucker J.C., Kopcow H.D., Carlyle J.R., Strominger J.L. TGF-beta affects development and differentiation of human natural killer cell subsets. *Eur. J. Immunol.*, 2010, Vol. 40, no. 8, pp. 2289-2295.

6. Carrega P., Ferlazzo G. Natural killer cell distribution and trafficking in human tissues. *Front. Immunol.*, 2012, Vol. 3, p. 347.

7. Chen Q., Ye W., Jian Tan W., Mei Yong K.S., Liu M., Qi Tan S., Loh E., Te Chang K., Chye Tan T., Preiser P.R., Chen J. Delineation of Natural Killer Cell Differentiation from Myeloid Progenitors in Human. *Sci. Rep.*, 2015, Vol. 5, p. 15118.

8. Croxatto D., Vacca P., Canegallo F., Conte R., Venturini P.L., Moretta L., Mingari M.C. Stromal cells from human decidua exert a strong inhibitory effect on NK cell function and dendritic cell differentiation. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 2, p. e89006.

9. Fauriat C., Long E.O., Ljunggren H.G., Bryceson Y.T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 11, pp. 2167-2176.

10. Freud A.G., Becknell B., Roychowdhury S., Mao H.C., Ferketich A.K., Nuovo G.J., Hughes T.L., Marburger T.B., Sung J., Baiocchi R.A., Guimond M., Caligiuri M.A. A human CD34(+) subset resides in lymph nodes and differentiates into CD56^{bright} natural killer cells. *Immunity*, 2005, Vol. 22, no. 3, pp. 295-304.

11. Gomez-Lopez N., Guilbert L.J., Olson D.M. Invasion of the leukocytes into the fetal-maternal interface during pregnancy. *J. Leukoc. Biol.*, 2010, Vol. 88, no. 4, pp. 625-633.

12. Hughes T., Becknell B., Freud A.G., McClory S., Briercheck E., Yu J., Mao C., Giovenzana C., Nuovo G., Wei L., Zhang X., Gavrilin M.A., Wewers M.D., Caligiuri M.A. Interleukin-1beta selectively expands and sustains interleukin-22+ immature human natural killer cells in secondary lymphoid tissue. *Immunity*, 2010, Vol. 32, no. 6, pp. 803-814.

13. Hughes T., Becknell B., McClory S., Briercheck E., Freud A.G., Zhang X., Mao H., Nuovo G., Yu J., Caligiuri M.A. Stage 3 immature human natural killer cells found in secondary lymphoid tissue constitutively and selectively express the TH 17 cytokine interleukin-22. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 17, pp. 4008-4010.

14. Ivarsson M.A., Loh L., Marquardt N., Kekalainen E., Berglin L., Bjorkstrom N.K., Westgren M., Nixon D.F., Michaelsson J. Differentiation and functional regulation of human fetal NK cells. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 9, pp. 3889-3901.

15. Jauniaux E., Watson A.L., Hempstock J., Bao Y.P., Skepper J.N., Burton G.J. Onset of maternal arterial blood flow and placental oxidative stress. A possible factor in human early pregnancy failure. *Am. J. Pathol.*, 2000, Vol. 157, no. 6, pp. 2111-2122.

16. Kaufmann P., Black S., Huppertz B. Endovascular trophoblast invasion: implications for the pathogenesis of intrauterine growth retardation and preeclampsia. *Biol. Reprod.*, 2003, Vol. 69, no. 1, pp. 1-7.

17. Keskin D.B., Allan D.S., Rybalov B., Andzelm M.M., Stern J.N., Kopcow H.D., Koopman L.A., Strominger J.L. TGFbeta promotes conversion of CD16⁺ peripheral blood NK cells into CD16⁻ NK cells with similarities to decidual NK cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 9, pp. 3378-3383.

18. Lehmann D., Spanholtz J., Sturtzel C., Tordoir M., Schlechta B., Groenewegen D., Hofer E. IL-12 directs further maturation of *ex vivo* differentiated NK cells with improved therapeutic potential. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 1, p. e87131.

19. Luevano M., Daryouzeh M., Alnabhan R., Querol S., Khakoo S., Madrigal A., Saudemont A. The unique profile of cord blood natural killer cells balances incomplete maturation and effective killing function upon activation. *Hum. Immunol.*, 2012, Vol. 73, no. 3, pp. 248-257.

20. Lysakova-Devine T., O'Farrelly C. Tissue-specific NK cell populations and their origin. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, Vol. 96, no. 6, pp. 981-990.

21. Male V., Hughes T., McClory S., Colucci F., Caligiuri M.A., Moffett A. Immature NK cells, capable of producing IL-22, are present in human uterine mucosa. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 7, pp. 3913-3918.

22. Male V., Sharkey A., Masters L., Kennedy P.R., Farrell L.E., Moffett A. The effect of pregnancy on the uterine NK cell KIR repertoire. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 10, pp. 3017-3027.

23. Manaster I., Mizrahi S., Goldman-Wohl D., Sela H.Y., Stern-Ginossar N., Lankry D., Gruda R., Hurwitz A., Bdolah Y., Haimov-Kochman R., Yagel S., Mandelboim O. Endometrial NK cells are special immature cells that await pregnancy. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 3, pp. 1869-1876.

24. Min-Oo G., Kamimura Y., Hendricks D.W., Nabekura T., Lanier L.L. Natural killer cells: walking three paths down memory lane. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 251-258.

25. Oboshi W., Watanabe T., Matsuyama Y., Kobara A., Yukimasa N., Ueno I., Aki K., Tada T., Hosoi E. The influence of NK cell-mediated ADCC: Structure and expression of the CD16 molecule differ among FcgammaRIIIa-V158F genotypes in healthy Japanese subjects. *Hum. Immunol.*, 2016, Vol. 77, no. 2, pp. 165-171.

26. Peng H., Jiang X., Chen Y., Sojka D.K., Wei H., Gao X., Sun R., Yokoyama W.M., Tian Z. Liver-resident NK cells confer adaptive immunity in skin-contact inflammation. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 4, pp. 1444-1456.

27. Piao H.L., Wang S.C., Tao Y., Fu Q., Du M.R., Li D.J. CXCL12/CXCR4 signal involved in the regulation of trophoblasts on peripheral NK cells leading to Th2 bias at the maternal-fetal interface. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, 2015, Vol. 19, no. 12, pp. 2153-2161.

28. Pinho M.J., Marques C.J., Carvalho F., Punzel M., Sousa M., Barros A. Genetic regulation on *ex vivo* differentiated natural killer cells from human umbilical cord blood CD34⁺ cells. *J. Recept. Signal. Transduct. Res.*, 2012, Vol. 32, no. 5, pp. 238-249.
29. Rolle A., Brodin P. Immune adaptation to environmental influence: the case of NK cells and HCMV. *Trends Immunol.*, 2016, Vol. 37, no. 3, pp. 233-243.
30. Romee R., Schneider S.E., Leong J.W., Chase J.M., Keppel C.R., Sullivan R.P., Cooper M.A., Fehniger T.A. Cytokine activation induces human memory-like NK cells. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 24, pp. 4751-4760.
31. Saito S., Nakashima A., Myojo-Higuma S., Shiozaki A. The balance between cytotoxic NK cells and regulatory NK cells in human pregnancy. *J. Reprod. Immunol.*, 2008, Vol. 77, no. 1, pp. 14-22.
32. Srivastava S., Pelloso D., Feng H., Voiles L., Lewis D., Haskova Z., Whitacre M., Trulli S., Chen Y.J., Toso J., Jonak Z.L., Chang H.C., Robertson M.J. Effects of interleukin-18 on natural killer cells: costimulation of activation through Fc receptors for immunoglobulin. *Cancer Immunol. Immunother.*, 2013, Vol. 62, no. 6, pp. 1073-1082.
33. Tao Y., Li Y.H., Piao H.L., Zhou W.J., Zhang D., Fu Q., Wang S.C., Li D.J., Du M.R. CD56(bright)CD25⁺ NK cells are preferentially recruited to the maternal/fetal interface in early human pregnancy. *Cell Mol. Immunol.*, 2015, Vol. 12, no. 1, pp. 77-86.
34. Tilburgs T., Evans J.H., Crespo A.C., Strominger J.L. The HLA-G cycle provides for both NK tolerance and immunity at the maternal-fetal interface. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2015, Vol. 112, no. 43, pp. 13312-13317.
35. Vivier E., Tomasello E., Baratin M., Walzer T., Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.*, 2008, Vol. 9, no. 5, pp. 503-510.
36. Wallace A.E., Goulwara S.S., Whitley G.S., Cartwright J.E. Oxygen modulates human decidual natural killer cell surface receptor expression and interactions with trophoblasts. *Biol. Reprod.*, 2014, Vol. 91, no. 6, pp. 134.
37. Yu J., Freud A.G., Caligiuri M.A. Location and cellular stages of natural killer cell development. *Trends Immunol.*, 2013, Vol. 34, no. 12, pp. 573-582.
38. Yun S., Lee S.H., Yoon S.R., Myung P.K., Choi I. Oxygen tension regulates NK cells differentiation from hematopoietic stem cells *in vitro*. *Immunol. Lett.*, 2011, Vol. 137, no. 1-2, pp. 70-77.

Авторы:

Михайлова В.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии, Санкт-Петербург, Россия

Белякова К.Л. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Сельков С.А. — д.м.н., профессор, заслуженный деятель науки, заведующий отделом иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Соколов Д.И. — д.б.н., заведующий лабораторией межклеточных взаимодействий отдела иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта»; ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, кафедра иммунологии; ведущий научный сотрудник отдела иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Mikhailova V.A., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Department of Immunology, St. Petersburg, Russian Federation

Belyakova K.L., Laboratory Assistant, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

Sokolov D.I., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Cell Interactions, Department of Immunology and Cell Interactions, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology; Pavlov First St. Petersburg State Medical University, Department of Immunology; Leading Research Associate, Department of Immunology, Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 06.09.2016
Отправлена на доработку 07.09.2016
Принята к печати 22.09.2016

Received 06.09.2016
Revision received 07.09.2016
Accepted 22.09.2016

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ГЕНОВ TLR/RLR-РЕЦЕПТОРОВ И СИНТЕЗ ЦИТОКИНОВ В ПРОЦЕССЕ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ THP-1 МОНОЦИТОВ В МАКРОФАГ-ПОДОБНЫЕ КЛЕТКИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ ФОРБОЛ-МИРИСТАТ-АЦЕТАТА (РМА)

Соколова Т.М., Полосков В.В., Шувалов А.Н., Ершов Ф.И.

Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Исследованы уровни экспрессии TLR/RLR- генов и продукция цитокинов в процессе дифференцировки клеток моноцитарной лейкемии THP-1 в морфологически зрелые макрофаги добавлением РМА (форбол 12-миристат 13-ацетат) через 1 и 5 дней. Впервые в зрелых макрофагах показаны высокие уровни стимуляции генов сигнальных иммунных рецепторов и факторов транскрипции и ингибирующее действие TLR3, TLR7/TLR8, TLR9-агонистов. Активированные РМА-THP-макрофаги секретируют в среду большие количества воспалительных цитокинов IL-1 β и TNF α .

Ключевые слова: клетки THP-1, дифференцировка РМА, макрофаги, гены TLR/RLRs, цитокины, TLR-агонисты

REGULATION OF TLR/RLR GENE ACTIVITY AND SYNTHESIS OF CYTOKINES DURING PHORBOL MYRISTATE ACETATE (PMA)-INDUCED DIFFERENTIATION OF THP-1 MONOCYTES INTO MACROPHAGE-LIKE CELLS

Sokolova T.M., Poloskov V.V., Shuvalov A.N., Ershov F.I.

N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Abstract. The levels of TLR/RLR gene expression and production of some cytokines were studied in monocytic THP-1 cell line during its differentiation to mature macrophage-like forms induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) treatment for 1 and 5 days *in vitro*. For the first time, we have shown high induction levels for the genes that encode signaling immune receptors and transcription factors in response to PMA, as well as inhibitory effects of TLR3, TLR7/TLR8, TLR9-agonists in mature macrophages. The PMA-activated THP-1 macrophage-like cells secreted large quantities of inflammatory IL-1 β and TNF α cytokines into culture medium.

Keywords: THP-1 cells, PMA, differentiation, macrophages, TLR/RLR genes, cytokines, TLR-agonists

Адрес для переписки:

Соколова Татьяна Михайловна
Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи
Министерства здравоохранения РФ
123098, Россия, Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (499) 193-43-19.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Address for correspondence:

Sokolova Tatiana M.
N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and
Microbiology
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18.
Phone: 7 (499) 193-43-19.
E-mail: tmsokolovavir@mail.ru

Образец цитирования:

Т.М. Соколова, В.В. Полосков, А.Н. Шувалов, Ф.И. Ершов
«Регуляция активности генов TLR/RLR-рецепторов
и синтез цитокинов в процессе дифференцировки THP-1
моноцитов в макрофаг-подобные клетки под действием
форбол-миристат-ацетата (РМА)» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 27-34.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-27-34

© Соколова Т.М. и соавт., 2017

For citation:

T.M. Sokolova, V.V. Poloskov, A.N. Shuvalov, F.I. Ershov
“Regulation of TLR/RLR gene activity and synthesis of cytokines
during phorbol myristate acetate (PMA)-induced differentiation
of THP-1 monocytes into macrophage-like cells”, *Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017,
Vol. 19, no. 1, pp. 27-34.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-27-34

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-27-34>

Введение

Клеточная линия ТНР-1 получена от ребенка с острой моноцитарной лейкемией [14]. Сегодня клетки ТНР-1 широко используются как модельная система *in vitro* для изучения регуляции дифференцировки моноцитов в макрофаги иммуномодулирующими препаратами [7, 12]. Добавление к суспензионной клеточной культуре ТНР-1 форболового эфира (форбол-12-миристан-13-ацетат — РМА) вызывает прикрепление клеток к стеклу (адгезию) и стабильное изменение их фенотипа на макрофаг-подобный. В литературе описаны оптимальные условия культивирования клеток ТНР-1 с РМА с целью достижения максимального сходства макрофагов с образующими из моноцитов в организме [8, 13]. Мы использовали разработанные методики в настоящей работе.

У человека известно 10 видов Toll-подобных рецепторов (TLRs), участвующих в распознавании разных молекулярных структур: микробные липопептиды (TLR1, TLR2, TLR6), липополисахариды (TLR4), флагелин (TLR5) и нуклеиновые кислоты (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [11]. Последние имеют эндосомальную локализацию. Дополнительно существуют два цитоплазматических сенсора RIG1 и MDA5 для вирусных и клеточных осРНК и дсРНК. Все перечисленные рецепторы широко представлены в иммунокомпетентных клетках. В реализации иммунных рецепторных TLR- и RLR-сигналов ключевую роль играют адапторы MyD88 и TRIF, IFN-регулируемый митохондриальный белок IPS, а также факторы транскрипции — универсальный NF-κB и IFN-регулируемые IRF3- и IRF7-активаторы промоторов генов воспалительных цитокинов и IFN типа I [10].

Процессы дифференцировки миелоидных предшественников и моноцитов в зрелые макрофаги и дендритные клетки являются ключевыми в адаптивном иммунном ответе на патогены. Механизмы клеточной регуляции во многом связаны с участием в них факторов сигнальной трансдукции, прежде всего с активацией TLR/RLR-рецепторов врожденного иммунитета [12]. Спектры активированных генов в макрофагах, дифференцированных РМА в культуре ТНР-1, имеют определенное сходство с макрофагами, полученными из моноцитов крови здоровых доноров добавлением ГМ-КСФ (гранулоцит-макрофаг-колоний-стимулирующий фактор) [9]. Однако в этой работе не были исследованы гены TLR/RLR-рецепторов врожденного иммунитета и ряд ключевых факторов сигнальной трансдукции.

В нашей работе впервые изучено действие РМА на экспрессию группы генов сигналь-

ной трансдукции в процессе дифференцировки ТНР-1 моноцитов в макрофаг-подобные клетки. Параллельно определена секреция воспалительных цитокинов и реакция на TLR-агонисты дифференцированными макрофагами.

Материалы и методы

Клетки ТНР-1 (острый моноцитарный лейкоз, ATCC TIB-202) получены из РОНЦ им. Н.Н. Блохина. Клетки культивировали с концентрацией 2×10^5 клеток/мл в среде RPMI-1640 с глутамином, 10% эмбриональной сывороткой телят и антибиотиками. В исследованиях *in vitro* ТНР-1 клетки были дифференцированы в макрофаги добавлением 50-100 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (РМА, Sigma-Aldrich) в течение 1 и 5 дней согласно известной процедуре РМА [8, 13]. Микроскопическое исследование монослоя ТНР-РМА-макрофагов проводили в инвертированном световом микроскопе DMIL (Leica Microsystems, Германия) при увеличении в 100 и 400 раз. Микрофотосъемку клеток выполняли с помощью оборудования Nikon digital camera DXM1200F.

Использовали TLR-агонисты из набора Human TLR1-TLR9 Agonist Kit (InvivoGen, USA). Агонисты добавляли в свежую культуральную среду на 5 день дифференцировки ТНР-РМА макрофагов. Концентрации TLR-агонистов соответствовали рекомендуем фирмой производителем и составляли poly(IC)NMW и poly(IC)LMW — 4 мкг/мл; ssRNA40 — 400 нг/мл. Препарат Ридостин «Диафарм» (Рибонуклеат натрия, смесь осРНК и дсРНК киллерных штаммов дрожжей *Sacharomyces cerevisiae*) добавлен в эффективной для ТНР-1 дозе 40 мкг/мл [1].

Анализ экспрессии генов проведен методом ОТ-ПЦР в реальном времени. Метод позволяет количественно оценить уровни синтеза мРНК в клетках. Суммарную РНК выделяли из ~1 млн клеток с помощью реагента PurZol (Bio-Rad, USA) согласно инструкции производителя. Выделенную РНК, осаждали изопропанолом и обрабатывали ДНК-азой (набор RNA-free, Ambion). На матрице суммарной РНК получали кДНК в реакции обратной транскрипции (ОТ) с random (случайные) праймерами. Использовали фермент MMuLV и 5x буфер ОТ, ингибитор RNAsin и 4 вида dNTP (Promega, USA).

Полученную кДНК в разведении 1/3 и 1/6 тестировали в количественной ПЦР с парами специфических олигонуклеотидных праймеров. Использовали 2-кратную смесь SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad, USA). Структура праймеров для мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, RIG1, MDA5, IPS, NF-κB, IRF3, IRF7 опубли-

кованы нами ранее [1-5]. Дополнительно в программе Primer 3 Blast рассчитаны пары праймеров к мРНК MyD88: прямой 5'-gtttcgatgcctcatctgct и обратный 5'-gtggccttctagccaacct; мРНК TRIF: прямой 5'-tttgtgatcctccacgccag и обратный 5'-ctgagtggctatggcgctcc. Синтез праймеров выполнен фирмой «Синтол» (Россия).

ПЦР ставили на приборе CFX-96 (Bio-Rad, США) в режиме реального времени. Протокол ПЦР: 96 °C 2 мин, далее 55 циклов 94 °C 10 с, 50-54 °C 20 с, 72 °C 30 с. Пороговые циклы (Cq) регистрировали в логарифмической фазе нарастания сигнала флуоресценции красителя EvaGreen. Относительная оценка кратности экспрессии генов (дельтаCq) сделана в программе CFX Manager «Gene expression analysis» в автоматическом режиме с оценкой средних стандартных ошибок в повторных образцах. Показатели контролей принимали равными 1.

В конечной точке ПЦР по температурным пикам плавления устанавливали специфичность ДНК-амплификатов. Дополнительно ПЦР-продукты анализировали электрофорезом в 1,5% агарозном геле с бромистым этидием на соответствие расчетным размерам.

Иммуноферментный анализ секретируемых клетками цитокинов IL-1 β , TNF α , IL-10, IFN α и IFN γ выполнен с помощью ИФА-наборов фирмы «Вектор-Бест» (Россия) согласно прилагаемой инструкции. Измерение оптической плотности и расчет средних концентраций повторных образцов в пг/мл выполнен на микропланшетном фотометре модель Anthos 2010 в программе ADAP+ (Биохим-Мак, Россия).

Статистическая обработка

Данные ОТ-ПЦР в реальном времени получены с 3 повторными образцами кДНК и представлены как средние значения дельтаCq со стандартными отклонениями (SD). Величины SD не превышали 15% от значений средних. Значимость различий между образцами оценена по t-критерию Стьюдента при $p < 0,05$ в программе Medcalc.

Результаты и обсуждение

Добавление к суспензионной культуре ТНР-1 моноцитов форболового эфира (PMA) в дозе от 50 до 100 мкг/мл вызывает прочное прикрепление клеток к поверхности стекла через 24 ч культивирования. После удаления PMA (смена питательной среды) клетки сохраняют адгезивные свойства на протяжении последующих 5 дней культивирования и меняют морфологию. Размеры клеток увеличиваются и подобно макрофагам содержат внутриклеточные включения (рис. 1А, Б).

По данным литературы [8], макрофаг-подобные ТНР-РМА приобретают иммунофенотип CD11b и резистентны к индукторам апоптоза. Механизм адгезивного действия PMA связан с активацией группы киназ, прежде всего протеинкиназы C, а также AMPK и Syk [6].

Исходная суспензионная культура ТНР-1 моноцитов имеет, по нашим данным [1], низкие и нестабильные конститутивные уровни экспрессии генов рецепторов врожденного иммунитета. В полученной монослойной культуре ТНР-РМА-макрофагов происходит выраженная активация транскрипции генов TLR/RLR рецепторов и факторов сигнальной трансдукции (рис. 2А, Б).

Исследования проведены на 1 и 5 день в 2-х независимых экспериментах, используя приблизительно равные количества клеток в контроле и опыте. PMA стимулирует транскрипцию мРНК TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9, их адапторов TRIF и MyD88, цитоплазматических хеликаз RIG1, MDA5 и фактора транскрипции NF- κ B. Ряд генов (TLR3, TLR7 и MDA5) активируются PMA быстро (через 24 ч). Группа генов TLR2, TLR3, TLR4, TLR8, TLR9 реагирует на форболовый эфир медленнее, их активность возрастает к 5 дню. Сравнительный анализ ПЦР-продуктов в агарозном геле на 1 и 5 день дифференцировки показывает наличие специфических ДНК-амплификатов с расчетными размерами (рис. 2Б).

Таким образом, процессы дифференцировки, вызываемые PMA в ТНР-1 моноцитах, сопровождаются ростом транскрипционной активности TLR/RLRs генов и их сигнальных факторов.

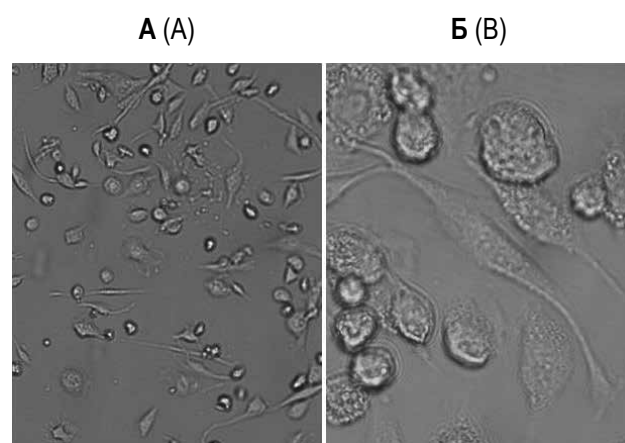


Рисунок 1. Морфология дифференцированных ТНР-макрофагов под действием PMA

Примечание. Срок исследования 24 ч, микрофотографии при увеличении в 100 (А) и 400 (Б) раз.

Figure 1. Morphology of PMA-differentiated THP macrophages
Note. 24-h treatment. Magnification of 100x (A), and 400x (B).

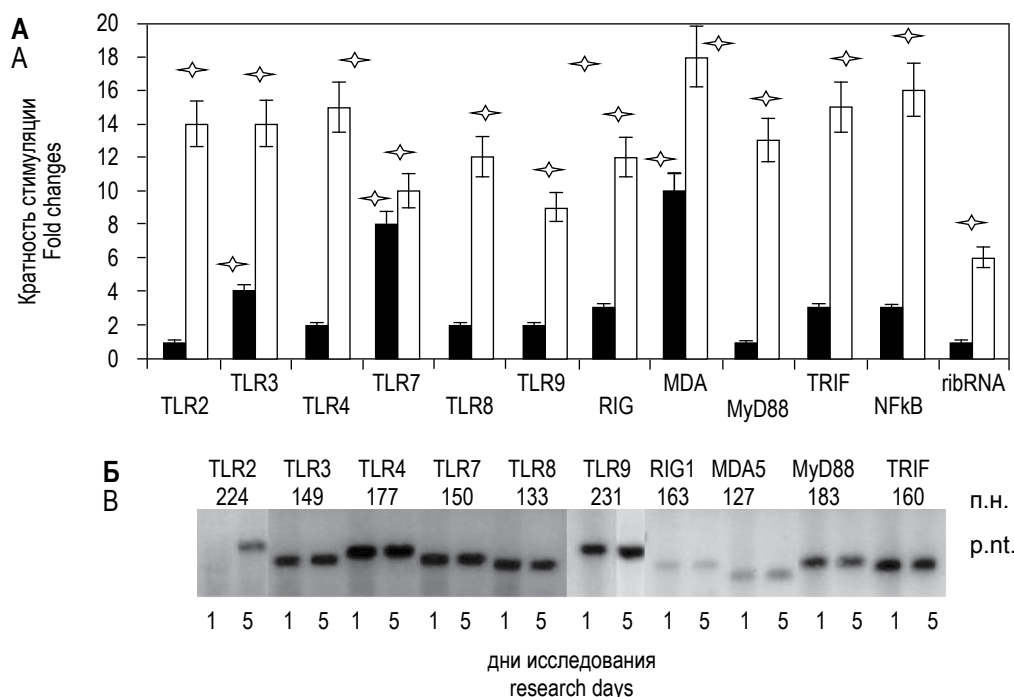


Рисунок 2. Стимуляция РМА экспрессии генов сигнальных рецепторов и адапторов в моноцитах THP-1 в процессе дифференцировки в макрофаги

Примечание. (А) По оси абсцисс – название генов, по оси ординат – кратность их стимуляции РМА (дельтаCq), относительно экспрессии генов в контроле клеток без РМА, принятых равными 1. Уровни стимуляции через 1 день (черный) и 5 дней (белый). Достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$ обозначены звездочками.

(Б) Электрофорез в 1,5% агарозном геле ПЦР-продуктов генов. Указаны размеры полученных ДНК-амплификатов в парах нуклеотидов (п.н.), соответствующие расчетным.

Figure 2. PMA-stimulated expression of signaling gene receptors and adaptors during THP-1 differentiation from monocytes to macrophages

Note. (A) Abscissa, gene designation. Ordinate, degree of PMA-induced gene expression (deltaCq) as ratios to gene expression in non-PMA-induced cells, taken as 1. Induction levels after 1 day (black) and 5 days of treatment (white). *, significant differences between experimental series ($p < 0.05$). (B) Electrophoretic patterns of gene-specific PCR products separated in 1.5% agarose gel. Calculated sizes of DNA amplicons (bp) are also shown.

ТАБЛИЦА 1. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ ТНР-МОНОЦИТАМИ ПОД ДЕЙСТВИЕМ РМА И ЛПС ЧЕРЕЗ 24 ч

TABLE 1. EFFECT OF PMA AND LPS ON CYTOKINE PRODUCTION BY THP-MONOCYTIC CELLS AFTER 24-h INCUBATION

Цитокины* Cytokines pg/ml*	Варианты обработки Treatment options		
	THP	THP+PMA	THP+ЛПС THP+LPS
IL-1 β	2-4	400-500	30-40
IL-10	0,4	20-25	2-3
TNF α	2-3	80-100	40-50
IFN α	2-3	2-3	2-3
IFN γ	1-2	1-4	1-4

Примечание. * – диапазон повторных измерений в 2-х опытах.

Note. * – Range of repeated measurements for two separate experiments.

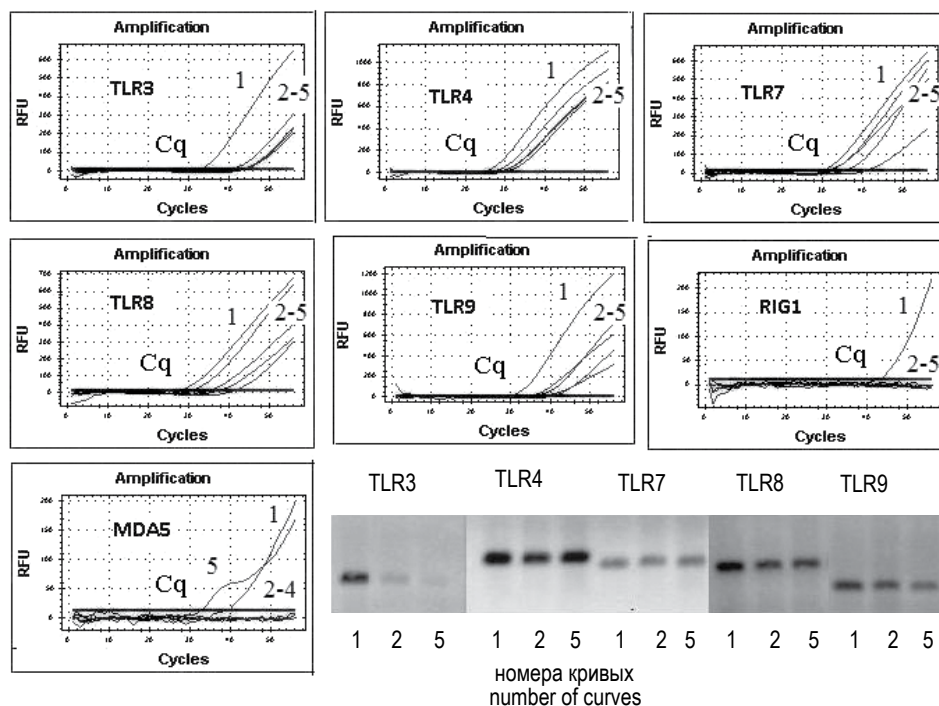


Рисунок 3. Действие TLR-агонистов на экспрессию TLR/RLRs генов в дифференцированных THP-ПМА-макрофагах
Примечание. По оси абсцисс – пороговые циклы амплификации Cq TLR/RLRs генов, по оси ординат – уровни включения флуоресцентного красителя Eva Green в ДНК-амплификаты. 1 – THP-ПМА-макрофаги, 2-5 – THP-ПМА-макрофаги + TLR-агонисты. Электрофорез в 1,5% агарозном геле ПЦР-продуктов.

Figure 3. Effect of TLR-agonists upon TLR/RLRs gene expression in differentiated PMA-induced THP macrophages
Note. Abscissa, threshold Cq values for appropriate TLR/RLRs gene amplified. Ordinate, levels of fluorescent Eva Green binding to DNA amplification products. 1, PMA-THP macrophages; 2 to 5, THP-PMA macrophages with addition of TLR-agonists. The PCR products were analysed by electrophoresis in 1.5% agarose gel.

ТАБЛИЦА 2. ДЕЙСТВИЕ TLR-АГОНИСТОВ НА ЭКСПРЕССИЮ TLR/RLRs ГЕНОВ В ДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫХ THP-ПМА МАКРОФАГАХ

TABLE 2. EFFECT OF TLR-AGONISTS UPON EXPRESSION OF TLR/RLR GENES IN DIFFERENTIATED THP-PMA MACROPHAGES

Агонисты Agonists	THP-PMA Cq	THP-PMA + polyIC HMW Cq1-Cq2	THP-PMA + polyIC LMW Cq1-Cq3	THP-PMA + ssRNA Cq1-Cq4	THP-PMA + РидостинCq1-Cq5 THP-PMA + Ridostin Cq1-Cq5
Гены Genes	1	2	3	4	5
TLR3	33	↓-11	↓-11	↓-11	↓-8
TLR4	26	↓-5	↓-3	↓-3	-1
TLR7	30	↓-2	↓-11	↓-2	↓-6
TLR8	29	↓-3	↓-6	↓-8	↓-13
TLR9	30	↓-11	↓-8	↓-5	↓-7
RIG1	43	↓*	↓*	↓*	↓*
MDA5	39	↓*	↓*	↓*	↑+6

Примечание. * – неопределяемые уровни экспрессии.
Note. * – non-detectable expression levels.

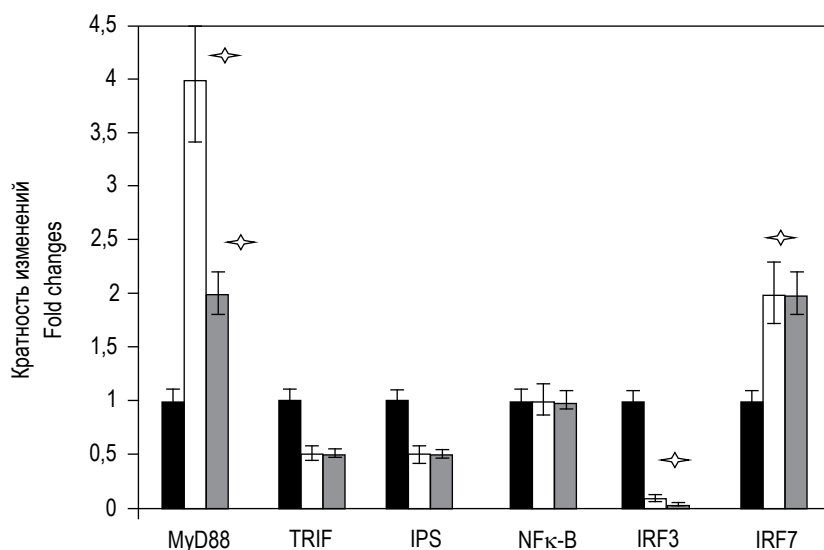


Рисунок 4. Действие TLR-агонистов на экспрессию генов сигнальных адапторов и факторов транскрипции в дифференцированных ТНР-РМА-макрофагах

Примечание. По оси абсцисс – название генов, по оси ординат – кратность изменений их активности. Контроль – ТНР-РМА-макрофаги принят равным 1 (черный), ТНР-РМА – макрофаги + poly IC HMW (белый), ТНР-РМА + Ридостин (серый). Достоверные различия между вариантами при $p < 0,05$ обозначены звездочками.

Figure 4. Effect of TLR-agonists on expression of signaling adaptor genes and transcription factors in differentiated PMA-THP macrophages

Note. Abscissa, gene designation. Ordinate, ratios of gene activity against controls. Control series, gene expression in PMA-THP macrophages, taken as 1 (black); PMA-THP macrophages + polyIC HMW (white); PMA-THP + Ridostin (grey). *, significant differences between experimental series ($p < 0.05$).

ТАБЛИЦА 3. ДЕЙСТВИЕ TLR-АГОНИСТОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ В ТНР-РМА-МАКРОФАГАХ

TABLE 3. EFFECTS OF TLR AGONISTS UPON PRODUCTION OF CYTOKINES IN THP-PMA MACROPHAGES

Варианты Treatment options	Цитокины* Cytokines, pg/ml*				
	IL-1 β	TNF α	IL-10	IFN α	IFN γ
ТНР-РМА, 5d	100-200	70-150	40-50	5-10	3-4
+ Ридостин + Ridostin	3000-3500	500-600	70-80	10-15	4-5
+ poly-IC	4000-4300	300-400	40-50	2-5	4-5
+ ssRNA	500-600	200-250	20-30	10-15	4-5

Примечание. Диапазон цитокинов в 2-х независимых опытах.

Note. Ranges of cytokine levels in two independent experiments.

Под действием РМА в ТНР-1 моноцитах возрастает и продукция воспалительных цитокинов (табл. 1).

Активированные макрофаги секретируют большие количества IL-1 β и TNF α и небольшие количества IL-10. Не обнаружено секреции ими IFN α и IFN γ . Тип цитокинов говорит об участии адаптора MyD88 и фактора NF- κ B. Цитокиновая реакция на липополисахарид (ЛПС), классический активатор ТНР-1 моноцитов, слабее, чем на форболовый эфир.

Особый интерес представляет ответ РМА-дифференцированных макрофагов на известные

TLR-агонисты. Нами исследованы 3 вида TLR-агонистов из набора фирмы InvivoGen: TLR3 – polyIC HMW и LMW (дсРНК высокого и низкого Мв), TLR8 – ssRNA40 (односпиральная РНК) и отечественный препарат Ридостин (смесь двуспиральных и односпиральных РНК дрожжей). Ридостин является активатором генов TLR3, TLR8, MDA5 сигнальных путей врожденного иммунитета, обеспечивающих синтез IFN и воспалительных цитокинов в клетках крови человека [2].

На рисунке 3 приведены данные ОТ-ПЦР в реальном времени (кривые накопления специфических ДНК-амплификатов TLR/RLR-генов

и последующий анализ их в агарозном геле). Видно, что в пробах ТНР-РМА макрофагов без TLR-агонистов (кривые 1) величины пороговых циклов (Cq) меньше величин Cq в пробах с добавлением TLR-агонистов (кривые 2-5). Это означает подавление агонистами экспрессии генов в дифференцированных ТНР-РМА макрофагах. Разница Cq (ТНР-РМА) – Cq(ТНР-РМА + агонисты) отрицательная (табл. 2).

Исключением является стимуляция Ридостином транскрипции гена MDA5. Между исследованными агонистами имеются определенные отличия по выраженности действия. Вместе с тем разные РНК/ДНК-структуры имеют и перекрестные мишени. Сильный ингибирующий эффект агонистов отмечен на эндосомальный ген TLR3 и цитоплазматические сенсоры RIG1/MDA5. PolyIC LMW и Ридостин снижает транскрипцию группы генов TLR3, TLR7, TLR8, TLR9. PolyIC HMW преимущественно подавляет экспрессию генов TLR3, TLR9. SsRNA40 (односпиральная РНК) ингибирует активность генов TLR3, TLR8, TLR9. В большей степени TLR-агонисты подавляют активность генов TLR3/TLR9 и, в меньшей степени, транскрипцию гена TLR4.

В зрелых ТНР-РМА-макрофагах polyIC HMW и Ридостин оказывают на гены факторов сигнальных путей слабо выраженное действие (рис. 4).

TLR-агонисты не влияют на активность гена фактора транскрипции NF-κB и слабо стимулируют транскрипцию генов MyD88 и IRF7. Однако агонисты заметно подавляют транскрипцию генов IFN-зависимых путей – IRF3, IPS и TRIF.

Ответ дифференцированных ТНР-РМА-макрофагов на TLR3, TLR7/TLR8 и TLR9-агонисты похож на описанный в зрелых дендритных клетках на TLR2/TLR4-агонист ЛПС [15]. Это дает нам основание считать, что в зрелых ТНР-РМА-макрофагах активация TLR/RLR-сигнальных процессов достигает максимума и включается механизм обратной связи.

При этом в зрелых ТНР-РМА-макрофагах не нарушается способность к продукции цитокинов (табл. 3).

Добавление к ним polyIC HMW, ssRNA40 и Ридостина усиливает секрецию ими IL-1β и TNFα (табл.1).

Таким образом, впервые показано, что дифференцировка ТНР-1 моноцитов в макрофаги под действием РМА сопровождается активацией сигнальных механизмов врожденного иммунитета с участием генов TLR/RLR-рецепторов, их адапторов и транскрипционного фактора NF-κB. Состояние зрелости активированных макрофагов проявляется негативной реакцией на TLR-агонисты. Вместе с тем дифференцированные макрофаги продолжают секретировать воспалительные цитокины IL-1β TNFα.

Важным является вопрос об отличиях свойств ТНР-РМА-макрофагов, полученных из клеток моноцитарной лейкемии, и макрофагов, образующихся из моноцитов крови здоровых доноров. Дальнейшие исследования позволят сравнить эти два типа макрофагов по генным реакциям и секретируемым цитокинам.

Список литературы / References

1. Соколова Т.М., Полосков В.В., Бурова О.С., Шувалов А.Н., Соколова З.А., Иншаков А.Н., Шишкин Ю.В., Ершов Ф.И. Действие интерферонов (ИФН) и ИФН-индукторов на экспрессию генов TLR/RLRs-рецепторов и дифференцировку опухолевых линий клеток ТНР-1 и НСТ-116 // Российский биотерапевтический журнал, 2016. Т.15, № 3. С. 28-33. [Sokolova T.M., Poloskov V.V., Burova O.S., Shuvalov A.N., Sokolova Z.A., Inshakov A.N., Shishkin Yu.V., Ershov F.I. Action interferons and IFN-inductors on TLR/RLRs genes expression and differentiation of tumor cell lines THP-1 and HCT-116. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Journal of Biotherapy*, 2016, Vol. 15, no. 3, pp. 28-33. (In Russ.)]
2. Соколова Т. М., Шувалов А. Н., Полосков В. В., Ершов Ф. И. Стимуляция генов сигнальной транскрипции препаратами Ридостин, Циклоферон и Ингавирин // Цитокины и воспаление, 2015. № 2. С. 26-34. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Ershov F.I. Stimulation of signaling transduction gene expression with drugs Ridostin, Cycloferon and Ingavirin. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, no. 2, pp. 26-34. (In Russ.)]
3. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Шаповал И.М., Соколова З.А., Ершов Ф.И. Активация генов сигнальных путей иммунитета: различная индивидуальная чувствительность клеток крови человека к препаратам интерферонов и индукторов ИФН // Медицинская иммунология, 2015. № 1. С. 7-18. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Shapoval I.M., Sokolova Z.A., Ershov F.I. Activation of genes controlling the immune signalling pathways: differential individual sensitivity of human blood cells for interferon preparations and IFN inducers. *Meditinskaya immynologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, no. 1, pp. 7-18. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-7-18>

4. Соколова Т.М., Шувалов А.Н., Полосков В.В., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Стимуляция экспрессии генов сигнальных рецепторов и индукция синтеза цитокинов в клетках крови человека при действии препарата «Рибонуклеат натрия» и его комбинаций с гриппозными вакцинами *in vitro* // Молекулярная медицина, 2015. № 1. С.12-17. [Sokolova T.M., Shuvalov A.N., Poloskov V.V., Shapoval I.M., Kostinov M.P. Stimulation of signaling receptors gene expression and induction of synthesis of cytokines in human blood cells by drugs "Ribonucleat sodium" and its combination with inactivated influenza vaccines. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2015, no. 1, pp. 12-17. (In Russ.)]
5. Шувалов А.Н., Соколова Т.М., Шаповал И.М., Ершов Ф.И. Модуляция транскрипции клеточных генов препаратом «Иммуномакс»: активация генов интерферонов и интерлейкинов // Иммунология, 2014. № 1. С. 17-21. [Shuvalov A.N., Sokolova T.M., Shapoval I.M., Ershov F.I. Modulation of cellular gene transcription by drug "Immunomax": activation of Interferon and Interleukine genes. *Immunologiya = Immunology*, 2014, no. 1, pp. 17-21. (In Russ.)]
6. Chang M-Y., Huang D-Yi, Ho F.M., Huang K-C., Lin W-W. PKC-dependent human monocyte adhesion requires AMPK and Syk activation. *Plos one* 2012, Vol. 7, Issue 7, e40999.
7. Chanput W., Mes J.J., Wichers H.J. THP-1 cell line: an *in vitro* cell model for immune modulation approach. *Int. Immunopharmacol.*, 2014, Vol. 23, no. 1, pp. 37-45.
8. Daigneault M., Preston J.A., Marriott H.M., Whyte M.K.B., Dockrell D.H. The identification of markers of macrophage differentiation in PMA-stimulated THP-1 cells and monocyte-derived macrophages. *PLos one*, 2010, Vol. 9, no. 1, e8668.
9. Kohro T., Tanaka T., Murakami T., Wada Y., Aburatani H., Hamakubo T., Kodama T. A. Comparison of differences in the gene expression profiles of phorbol12-myristate13-acetate differentiated THP-1 cells and human monocyte-derived macrophage. *J. of Atheroscler Tromb*, 2004, Vol. 11, pp. 88-97.
10. Lester S.N., Li K. Toll-like receptors in antiviral innate immunity. *J. Mol. Biol.*, 2014, Vol. 426, no. 6, pp. 1246-1264.
11. Paul-Clark M.J., George P.M., Gatheral T., Parzych K., Wright .R., Crawford D., Bailey L.K., Reed D.M., Mitchell J.A. Pharmacology and therapeutic potential of pattern recognition receptors. *Pharmacol. Ther.*, 2012, Vol. 135, no. 2, pp. 200-215.
12. Remer K.A., Brcic M., Sauler K.S., Jungi T.W. Human monocytoic cells as a model to study Toll-like receptor-mediated activation. *J. Immunol Methods*. 2006, Vol. 313, no. 1-2, pp. 1-10.
13. Schwende H., Fitzke E., Ambs P., Dieter P. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. *J. Leukoc. Biol.*, 1996, Vol. 59, pp. 555-561.
14. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., Kobayashi Y., Konno T., Tada K. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int. J. Cancer*, 1980, Vol. 26, pp. 171-176.
15. Visintin A., Mazzoni A., Spitzer J.H., Wyllie D.H., Dower S.K., Segal D.M. Regulation of Toll-Like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 1, pp. 249-255.

Авторы:

Соколова Т.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Полосков В.В. — младший научный сотрудник лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шувалов А.Н. — младший научный сотрудник лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ершов Ф.И. — д.м.н., профессор, академик РАН, руководитель отдела интерферонов и лаборатории интерфероногенеза Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Sokolova T.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Poloskov V.V., Junior Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Shuvalov A.N., Junior Research Associate, Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Ershov F.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Chief, Department of Interferons and Laboratory of Interferonogenesis, N.F. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 16.09.2016
Принята к печати 19.09.2016

Received 16.09.2016
Accepted 19.09.2016

СОСТОЯНИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА ПРИ HCV-АССОЦИИРОВАННОМ ФИБРОЗЕ ПЕЧЕНИ

Горелова И.С., Скляр Л.Ф., Маркелова Е.В., Симакова А.И., Зенин И.В.

ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Резюме. Известно, что дисбаланс системы «протеолиз—антипротеолиз» является одним из ключевых звеньев иммунофиброгенеза печени при хроническом гепатите С (ХГС). С целью изучения данной проблемы был исследован сывороточный и локальный профиль регуляторов ремоделирования ткани печени при HCV-ассоциированном фиброзе печени по уровню матриксной металлопротеиназы-9 (ММР-9), тканевого ингибитора матриксной металлопротеиназы-1 (ТИМР-1), комплексов ММР-9/ТИМР-1 и ММР-9/ТИМР-2. Проведено комплексное клинико-лабораторное и инструментальное обследование 81 пациента с ХГС, которые не получали противовирусную терапию (ПВТ), и 22 практически здоровых добровольцев. Изучены показатели белков внеклеточного матрикса (ВКМ) в 103 образцах сыворотки крови и 32 супернатантах гепатобиоптатов методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). Отмечено статистически значимое повышение содержания ММР-9 ($p < 0,05$) и ее комплексов с ТИМР-1 ($p < 0,05$) и ТИМР-2 ($p < 0,01$) в сочетании с низким показателем ингибитора первого типа ($p < 0,05$) в сыворотке крови HCV-инфицированных пациентов относительно контрольной группы. Анализ содержания белков, отражающих состояние межклеточного матрикса, в супернатантах гепатобиоптатов у пациентов ХГС выявил восьмикратное увеличение уровня комплекса ММР-9/ТИМР-1 в сравнении с группой контроля ($p < 0,05$), при этом значения других представителей семейства протеолиз/антипротеолиз оказались низкими ($p < 0,05$). Обнаружен дисбаланс содержания протеиназ в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов, который имел различную направленность изменений, а именно — сывороточные значения ММР-9, ТИМР-1 и ММР-9/ТИМР-2 по мере трансформации фиброза печени в цирроз (от F0 ст. к F4 ст.) снижались ($p < 0,05$), но при этом концентрация указанных протеолитических ферментов в органе-мишени повышалась ($p < 0,05$). Обобщая вышесказанное, можно заключить, что полученные нами данные в результате исследования свидетельствуют о том, что нарушение равновесия системы «протеолиз/антипротеолиз» приводит к дисрегуляции ремоделирования ткани печени при ХГС.

Ключевые слова: матриксная металлопротеиназа, тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы, хронический гепатит С, фиброз печени

EXTRACELLULAR MATRIX CONDITION IN CASE OF HCV-ASSOCIATED LIVER FIBROSIS

Gorelova I.S., Sklyar L.F., Markelova E.V., Simakova A.I., Zenin I.V.

Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Imbalance of the proteolysis/antiproteolysis system is known to be among key components of immunofibrogenesis of liver in cases of chronic hepatitis C. To evaluate these aspects, we studied several factors

Адрес для переписки:

Горелова Ирина Сергеевна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
690089, Россия, г. Владивосток, ул. Тухачевского, 56-50.
Тел.: 8 (908) 446-04-53.
E-mail: Gorelova_ira@mail.ru

Address for correspondence:

Gorelova Irina S.
Pacific State Medical University
690089, Russian Federation, Vladivostok,
Tukhachevsky str., 56-50.
Phone: 7 (908) 446-04-53.
E-mail: Gorelova_ira@mail.ru

Образец цитирования:

И.С. Горелова, Л.Ф. Скляр, Е.В. Маркелова, А.И. Симакова, И.В. Зенин «Состояние внеклеточного матрикса при HCV-ассоциированном фиброзе печени» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 35-44. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-35-44

© Горелова И.С. и соавт., 2017

For citation:

I.S. Gorelova, L.F. Sklyar, E.V. Markelova, A.I. Simakova, I.V. Zenin "Extracellular matrix condition in case of HCV-associated liver fibrosis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 35-44. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-35-44

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-35-44>

of liver tissue remodeling in blood serum and local samples from HCV patients associated with liver fibrosis. We determined the levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-1 (TIMP-1), MMP-9/TIMP-1 and MMP-9/TIMP-2 complexes. Clinical, laboratory and instrumental examinations have been made for 81 patients with chronic hepatitis C who did not receive antiviral therapy, and 22 healthy volunteers. Extracellular matrix protein (ECM) profile was studied in 103 serum blood samples and 32 liver supernates using ELISA technique. Statistically significant increase of MMP-9 contents ($p < 0.05$) and its complexes with TIMP-1 ($p < 0.05$) and TIMP-2 ($p < 0.01$), as well as low levels of type 1 inhibitor ($p < 0.05$) were revealed in blood serum of HCV-infected patients, as compared with control group. Protein assays in liver supernates of hepatitis C patients reflecting extracellular matrix state revealed an eight-fold increase in MMP-9/TIMP-1 complex, as compared with control group ($p < 0.05$). The values of other proteolytic/antiproteolytic factors proved to be low ($p < 0.05$). An imbalance in protease contents in blood serum and liver biopsies was revealed, showing differently directed changes. I.e., serum values of MMP-9, TIMP-1 and MMP-9/TIMP-2 during transition of liver fibrosis to cirrhosis (F0 to F4) became decreased ($p < 0.05$), associated with increased liver concentrations of these proteolytic enzymes ($p < 0.05$). In summary, we conclude that the data obtained in our study suggest an imbalance of proteolysis/antiproteolysis system leads to a dysregulated liver tissue remodeling in patients with chronic hepatitis C.

Keywords: matrix metalloproteinase, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase, chronic hepatitis C, liver fibrosis

Введение

Современные данные отечественной и зарубежной литературы свидетельствуют, что фиброгенез в печени — это универсальный патофизиологический процесс, характеризующийся нарушением равновесия между продукцией и деградацией компонентов экстрацеллюлярного матрикса [1, 18, 22]. Данный дисбаланс способствует чрезмерному синтезу внеклеточных протеинов, их накоплению и отложению в печени, а, следовательно, перестройке архитектоники органа-мишени с формированием в конечном итоге цирроза печени [12, 14, 15].

Огромную роль в иммунопатогенезе фиброза печени играет дисбаланс в системе матриксных металлопротеиназ (ММП) и тканевых ингибиторов матриксных металлопротеиназ (ТИМП) [1, 9, 18, 19]. Нарушение равновесия характеризуется снижением и/или увеличением активности ММП и/или ТИМП, что отражает структурные изменения печенной ткани [11, 15, 17].

Вышеуказанное и определило наш интерес к изучению семейства протеиназ/антипротеиназ, некоторых его представителей, на системном уровне, в сыворотке крови, и на локальном, в супернатантах гепатобиоптатов, при HCV-инфекции во взаимосвязи с морфологическими параметрами.

Целью данной работы явилось изучение сыровоточного и локального профиля регуляторов ремоделирования ткани печени при HCV-ассоциированном фиброзе печени по уровню MMP-9, TIMP-1, комплексов MMP-9/TIMP-1 и MMP-9/TIMP-2.

Материалы и методы

Под наблюдением находился 81 пациент в возрасте от 23 до 60 лет (средний возраст $44,4 \pm 9,9$ лет) с диагнозом хронический гепатит С (ХГС). Преобладали женщины — 56 чел. (69,1%), мужчин было 25 чел. (30,9%). Противовирусную терапию пациенты не получали.

Диагноз ХГС устанавливали на основании совокупности клинико-анамнестических, эпидемиологических, лабораторных и инструментальных данных, включая пункционную биопсию печени (ПБП). Все пациенты с HCV-инфекцией по результатам эластографии печени и/или гистологического исследования гепатобиоптатов были распределены в зависимости от стадии фиброза печени на три группы: I-я — пациенты, у которых признаки фиброза отсутствуют (F0 ст.) — 24 чел. (29,6%), II-я — пациенты со слабо-выраженным и умеренным фиброзом (F1-2 ст.) — 26 чел. (32,1%), III-я — пациенты с выраженным фиброзом и циррозом печени (F3-4 ст.) — 31 чел. (38,3%).

Контрольную группу составили 22 клинически здоровых добровольца, сопоставимых по полу и возрасту с контингентом HCV-инфицированных пациентов.

Для достижения поставленной цели нами проведено комплексное клинико-лабораторное, инструментальное и иммунологическое исследование. В качестве биологических материалов для исследования использовались венозная кровь и биоптаты печени обследованных лиц. Всем обследованным лицам проводились ультразвуковое исследование органов брюшной полости и эла-

стометрия печени. Чрескожная ПБП иглой Менгини была выполнена по индивидуальному протоколу для каждого пациента после получения информированного согласия и при отсутствии всех существующих противопоказаний к проведению данной манипуляции. Анализ морфологических данных на биопсийном материале был проведен у 32 человек (31,1%).

Для иммунологических исследований содержания регуляторов фиброгенеза по уровню MMP-9, TIMP-1, комплекса MMP-9/TIMP-1 и MMP-9/TIMP-2 использовались сыворотка венозной крови и супернатанты гепатобиоптатов обследованных лиц. Определение уровня указанных параметров в биологических субстратах проводили с помощью специфических реактивов фирмы R&D Diagnostics Inc (США) методом сэндвич-варианта твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) в соответствии с инструкцией по применению. Содержание их выражали в нанограммах и пикограммах на миллилитр (нг/мл и пг/мл соответственно).

Математическая обработка полученных результатов проведена с помощью пакета прикладных программ BIOSTATISTICA (S.A. Glantz, McGraw Hill), STATISTICA 6.0 (StatSoft, USA).

Результаты

Исследование отдельных представителей семейства внеклеточных протеиназ и их тканевых ингибиторов в сыворотке крови HCV-инфицированных пациентов обнаружило изменения изучаемых показателей относительно контрольной группы здоровых лиц (табл. 1). А именно, отмечено статистически значимое повышение концентрации MMP-9 ($p < 0,05$), а также ее комплексов с TIMP-1 ($p < 0,05$) и TIMP-2 ($p < 0,01$) в сочетании с низким уровнем ингибитора первого типа ($p < 0,05$).

Анализ содержания изучаемых белков внеклеточного матрикса (ВКМ) в органе-мишени при ХГС выявил статистически значимые отличия по сравнению с аналогичными показателями контрольной группы ($p < 0,05$). Данные из таблицы 2 свидетельствуют о снижении концентрации MMP-9 ($p < 0,05$), TIMP-1 ($p < 0,05$) и MMP-9/TIMP-2 ($p < 0,05$). Что касается комплекса MMP-9/TIMP-1, то наблюдается высокий уровень его в супернатантах гепатобиоптатов, который превышал аналогичный показатель у здоровых лиц более чем в 8 раз и составил $34,4 \pm 1,2$ нг/мл ($p < 0,05$).

ТАБЛИЦА 1. СЫВОРОТОЧНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ММР/ТИМП ПРИ ХГС, $M \pm s$

TABLE 1. SERUM INDICATORS OF THE SYSTEM OF MMP/TIMP IN CASE OF CHC, $M \pm s$

Показатели Indicators	Здоровые доноры (n = 22) Control group	Пациенты ХГС (n = 81) Patients with CHC
MMP-9, ng/ml	189,3 $\pm$ 9,2	241,3 $\pm$ 6,7*
TIMP-1, ng/ml	222,0 $\pm$ 7,3	187,6 $\pm$ 5,7*
MMP-9/TIMP-1, ng/ml	5,0 $\pm$ 0,6	13,7 $\pm$ 1,1*
MMP-9/TIMP-2, pg/ml	2,9 $\pm$ 0,7	46,9 $\pm$ 2,8**

Примечание. Статистическая значимость различий (p) с контрольной группой: * – $p < 0,05$; ** – $p < 0,01$.

Note. Statistical significance of the differences (p) with the control group: * – $p < 0.05$; ** – $p < 0.01$.

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ ММР/ТИМП В СУПЕРНАТАНТАХ ГЕПАТОБИОПТАТОВ ПРИ ХГС, $M \pm s$

TABLE 2. INDICATORS OF THE SYSTEM OF MMP/TIMP IN LIVER SUPERNATANTS IN CASE OF CHC, $M \pm s$

Показатели Indicators	Здоровые доноры (n = 7) Control group	Пациенты ХГС (n = 25) Patients with CHC
MMP-9, ng/ml	516,0 $\pm$ 21,6	158,5 $\pm$ 13,6*
TIMP-1, pg/ml	60,0 $\pm$ 18,0	10,0 $\pm$ 2,0*
MMP-9/TIMP-1, ng/ml	4,1 $\pm$ 1,1	34,4 $\pm$ 1,2*
MMP-9/TIMP-2, pg/ml	57,8 $\pm$ 1,2	51,0 $\pm$ 1,2*

Примечание. Статистическая значимость различий (p) с контрольной группой: * – $p < 0,05$.

Note. Statistical significance of the differences (p) with the control group: * – $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 3. ПОКАЗАТЕЛИ СИСТЕМЫ MMP/TIMP В СЫВОРОТКЕ КРОВИ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ПРИ ХГС, M±s

TABLE 3. INDICATORS OF THE SYSTEM OF MMP/TIMP IN BLOOD SERUM DEPENDING ON THE STAGE OF LIVER FIBROSIS IN CASE OF CHC, M±s

Показатели Indicators	Здоровые доноры (n = 22) Control group	Пациенты ХГС (n = 81) Patients with CHC	Группы пациентов (n = 81) Groups of patients		
			F0 ст., n = 24 F0 st.	F1-2 ст., n = 26 F1-2 st.	F3-4 ст., n = 31 F3-4 st.
			1	2	3
MMP-9, ng/ml	189,3±9,2	241,3±6,7*	249,9±6,1* p ₁₋₂ < 0,05	269,0±7,4** p ₂₋₃ < 0,05	205,3±6,6* p ₁₋₃ < 0,05
TIMP-1, ng/ml	222,0±7,3	187,6±5,7*	194,8±4,9* p ₁₋₂ < 0,05	205,4±5,2* p ₂₋₃ < 0,05	162,7±6,9* p ₁₋₃ < 0,05
MMP-9/ TIMP-1, ng/ml	5,0±0,6	13,7±1,1*	7,1±0,8* p ₁₋₂ < 0,05	13,1±1,1* p ₂₋₃ < 0,05	21,0±1,3* p ₁₋₃ < 0,05
MMP-9/ TIMP-2, pg/ml	2,9±0,7	46,9±2,8*	65,0±3,5** p ₁₋₂ < 0,05	41,8±2,2* p ₂₋₃ < 0,05	33,9±2,7* p ₁₋₃ < 0,05

Примечание. Статистическая значимость различий (p): с контрольной группой: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; между группами p₁₋₂, p₁₋₃, p₂₋₃.

Note. Statistical significance of the differences (p): with the control group: * – p < 0.05, ** – p < 0.01; between groups p₁₋₂, p₁₋₃, p₂₋₃.

Результаты исследований сывороточного уровня белков, отражающих состояние межклеточного матрикса, у пациентов ХГС в зависимости от выраженности фиброзных изменений в печени приведены в таблице 3.

При анализе содержания MMP-9 в сыворотке крови с учетом стадии фиброза печени НСВ-этиологии были выявлены статистически значимые различия (p < 0,05). При отсутствии морфологических изменений в органе-мишени среднее значение изучаемого протеолитического фермента составило 249,9±6,1 нг/мл, что статистически значимо отличалось от нормы (p < 0,05). По мере прогрессирования патологического процесса концентрация его повышалась, однако с формированием тяжелой стадии фиброза и цирроза печени уровень MMP-9 резко снижался, но все же превышал аналогичные показатели контрольной группы (p < 0,05). Оценивая корреляционные связи, нами определена обратная взаимосвязь средней силы между сывороточным содержанием исследуемого маркера и нарушением архитектоники органа-мишени (r_s = -0,45; p < 0,05).

Как видно из таблицы 3, концентрация тканевого ингибитора первого типа в сыворотке крови в зависимости от выраженности НСВ-ассоциированных фиброзных изменений в печени была снижена по сравнению с контролем (p < 0,05) и наименьшая регистрировалась при циррозе – 162,7±6,9 нг/мл. Нами обнаруже-

на обратная средняя корреляция между уровнем TIMP-1 и накоплением соединительной ткани в печени (r_s = -0,36; p < 0,05).

Сывороточные показатели MMP-9/TIMP-1 и MMP-9/TIMP-2 у пациентов ХГС имели разнонаправленный характер с прогрессированием фиброза печени. А именно, отмечено увеличение концентрации MMP-9/TIMP-1 с F0 ст. до F3-4 ст. (p < 0,05) и уменьшение содержания MMP-9/TIMP-2 (p < 0,05). При этом зафиксирована статистически значимая корреляция между уровнем исследуемых комплексов и морфологическими изменениями в печени: для MMP-9/TIMP-1 выявлена прямая сильная связь (r_s = 0,95; p < 0,05) и MMP-9/TIMP-2 – обратная связь средней силы (r_s = -0,41; p < 0,05).

Нами исследован локальный профиль системы «протеолиза–антипротеолиза» при ХГС в зависимости от выраженности фиброзных изменений в органе-мишени (табл. 4).

Локальные показатели MMP-9 и MMP-9/TIMP-2 имели схожий характер изменений с учетом стадии фиброза печени: содержание указанных белков ВКМ во всех группах пациентов было ниже относительно здоровых (p < 0,05). По мере прогрессирования морфологических изменений в печени выявлена тенденция к снижению концентрации MMP-9 и MMP-9/TIMP-2, которая оказалась наименьшей при F1-2 ст.: 105,7±12,8 нг/мл (p>0,05) и 45,7±1,6 пг/мл (p < 0,05) соответственно. Однако, формирова-

ТАБЛИЦА 4. ЛОКАЛЬНЫЙ ПРОФИЛЬ СИСТЕМЫ ММР/ТИМР В ЗАВИСИМОСТИ ОТ СТАДИИ ФИБРОЗА ПЕЧЕНИ ПРИ ХГС, М±s

TABLE 4. LOCAL PROFILE OF THE SYSTEM OF MMP/TIMP DEPENDING ON THE STAGE OF LIVER FIBROSIS IN CASE OF CHC, M±s

Показатели Indicators	Здоровые доноры (n = 7) Control group	Пациенты ХГС (n = 25) Patients with CHC	Группы пациентов (n = 25) Groups of patients		
			F0 ст., n = 11 F0 st.	F1-2 ст., n = 8 F1-2 st.	F3-4 ст., n = 6 F3-4 st.
			1	2	3
MMP-9, ng/ml	516,0±21,6	158,5±13,6*	115,4±13,6* p ₁₋₂ > 0,05	105,7±12,8* p ₂₋₃ < 0,05	254,3±14,3* p ₁₋₃ < 0,05
TIMP-1, pg/ml	60,0±18,0	10,0±2,0*	16,0±2,0* p ₁₋₂ < 0,05	8,0±2,0** p ₂₋₃ > 0,05	6,0±1,0** p ₁₋₃ < 0,05
MMP-9/ TIMP-1, ng/ml	4,1±1,1	34,4±1,2*	9,8±0,9* p ₁₋₂ < 0,05	37,0±1,5* p ₂₋₃ < 0,05	56,5±1,3** p ₁₋₃ < 0,05
MMP-9/ TIMP-2, pg/ml	57,8±1,2	51,0±1,2*	52,0±1,1* p ₁₋₂ < 0,05	45,7±1,6* p ₂₋₃ < 0,05	55,3±1,0* p ₁₋₃ < 0,05

Примечание. Статистическая значимость различий (p): с контрольной группой: * – p < 0,05; ** – p < 0,01; между группами p₁₋₂, p₁₋₃, p₂₋₃.

Note. Statistical significance of the differences (p): with the control group: * – p < 0.05, ** – p < 0.01; between groups p₁₋₂, p₁₋₃, p₂₋₃.

ние цирроза печени при HCV-инфекции ассоциировалось с ростом изучаемых медиаторов, средние значения которых были наиболее высокими среди исследуемых групп пациентов (p < 0,05). При корреляционном анализе обнаружена прямая средней силы связь между уровнем MMP-9 и нарушением архитектоники печеночной ткани (r_s = 0,58; p < 0,05), а в отношении MMP-9/TIMP-2 – слабая связь (r_s = 0,24; p < 0,05).

Установлены разнонаправленные изменения содержания TIMP-1 и MMP-9/TIMP-1 в супернатантах гепатобиоптатов в зависимости от выраженности фиброзных изменений в печени: средние значения TIMP-1 снижались от F0 ст. до F3-4 ст. (p < 0,05) и, напротив, показатели MMP-9/TIMP-1 повышались (p < 0,05). Зафиксированы статистически значимые взаимосвязи концентрации указанных протеиназ и их комплексов со структурными нарушениями в печени: для TIMP-1 определена обратная корреляция средней силы (r_s = -0,56), а для MMP-9/TIMP-1 – прямая сильная связь (r_s = 0,96; p < 0,05).

Обсуждение

В настоящее время одним из ведущих механизмов развития фиброза печени считают нарушение равновесия в системе MMP/TIMP, следствием которого является дисбаланс между

синтезом и разрушением компонентов межклеточного матрикса [9, 16, 18, 22].

Исследование отдельных представителей семейства внеклеточных протеиназ и их тканевых ингибиторов в сыворотке крови HCV-инфицированных пациентов обнаружило изменения изучаемых показателей относительно контрольной группы здоровых лиц. Отмечено статистически значимое повышение содержания MMP-9 (p < 0,05) и ее комплексов с TIMP-1 (p < 0,05) и TIMP-2 (p < 0,01) в сочетании с низким уровнем ингибитора первого типа (p < 0,05). В современной литературе, как отечественной, так и зарубежной, приводятся противоречивые данные в отношении дисбаланса в системе матриксина. Так, работы одних авторов согласуются с полученными нами результатами [3, 12], в то же время встречаются исследования, в которых установлен противоположный характер нарушений указанных показателей [10, 22]. Отсутствие единой точки зрения в понимании процессов ремоделирования ткани печени при HCV-инфекции требует комплексного изучения системы «протеолиз/антипротеолиз» не только в сыворотке крови, но и в органе-мишени.

При анализе содержания белков, отражающих состояние межклеточного матрикса, в супернатантах гепатобиоптатов у пациентов ХГС выявлено восьмикратное увеличение уровня ком-

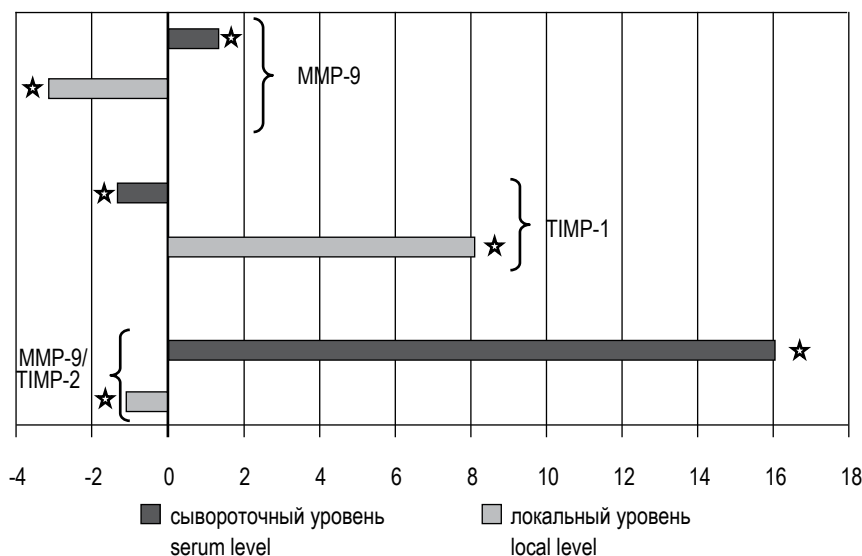


Рисунок 1. Схематическое изображение изменений показателей системы MMP/TIMP в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов при ХГС относительно границы контроля (|)

Примечание. * – статистическая значимость различий (p) с контрольной группой – p < 0,05-0,01.

Figure 1. Schematic representation of directed changes in MMP/TIMP levels in blood serum and liver supernates in chronic hepatitis C, in comparison with control values (|)

Note. * – the differences against control group are statistically significant by p < 0.05-0.01.

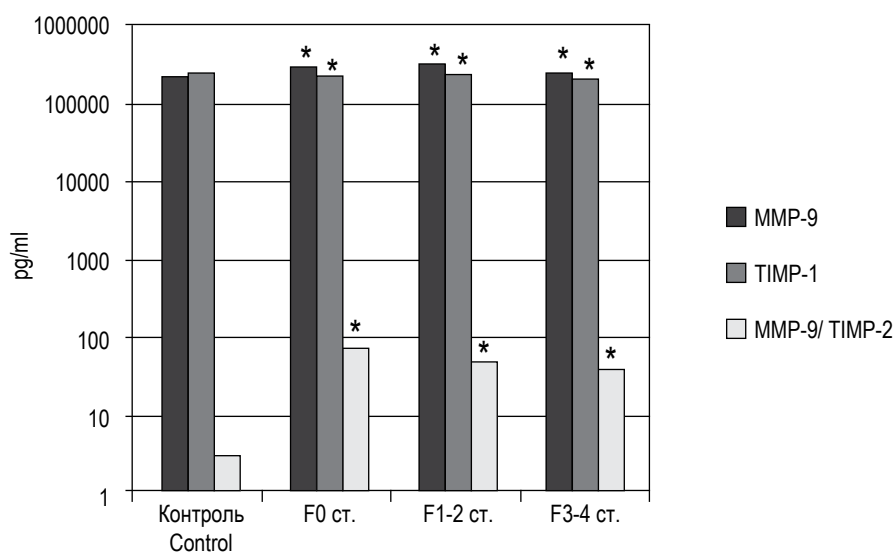


Рисунок 2. Показатели системы MMP/TIMP в сыворотке крови в зависимости от стадии фиброза печени при ХГС

Примечание. * – статистическая значимость различий (p) с контрольной группой – p < 0,05-0,001.

Figure 2. Indices of MMP/TIMP system in blood serum depending on stage of liver fibrosis in chronic hepatitis C.

Note. * – the differences against control group are statistically significant by p < 0.05-0.01.

плекса MMP-9/TIMP-1 в сравнении с группой контроля (p < 0,05), при этом значения других представителей семейства протеиназ оказались низкими (p < 0,05). Известно, что активность металлопротеиназ контролируется их эндогенными ингибиторами, синтез и экскреция которых тесно сопряжены с продукцией MMP [2, 14, 19, 22]. Так, они избирательно стехиометрически связываются с протеиназами и образуют необратимые комплексы, в которых MMP и TIMP

находятся в соотношении 1:1 [5, 8, 9, 18]. С учетом вышесказанного нами пересмотрен профиль изучаемой системы «протеолиз/антипротеолиз» в сыворотке крови, а также в супернатантах гепатобиоптатов, и обнаружены изменения показателей только на локальном уровне (рис. 1). А именно, зарегистрировано увеличение концентрации TIMP-1, что может объяснить наличие низких значений MMP-9 в органе-мишени при HCV-инфекции.

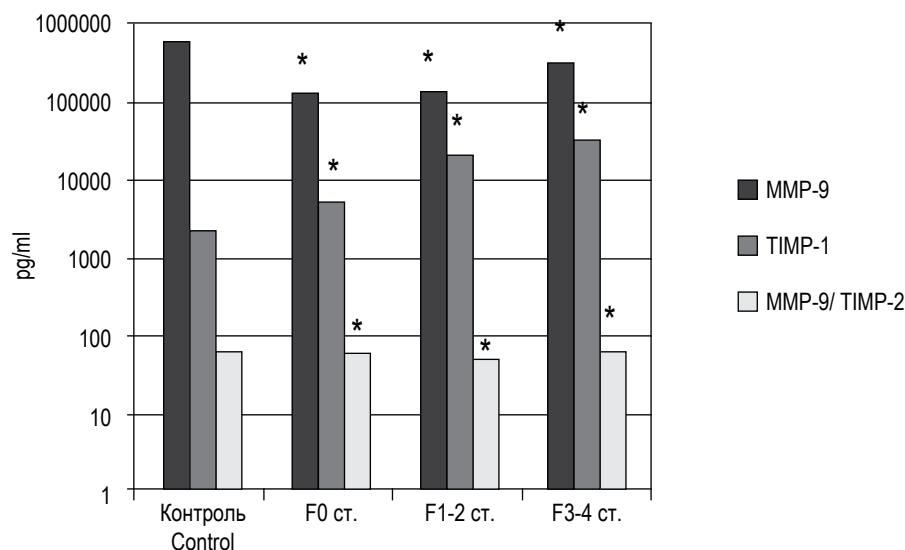


Рисунок 3. Показатели системы ММР/ТИМП в супернатантах гепатобиоптатов в зависимости от стадии фиброза печени при ХГС

Примечание. * – статистическая значимость различий (p) с контрольной группой – $p < 0,05-0,001$

Figure 3. Indices of MMP/TIMP system in liver supernates depending on the stage of liver fibrosis in chronic hepatitis C.

Note. * – the differences against control group are statistically significant by $p < 0.05-0.01$.

В доступной литературе отсутствуют работы, рассматривающие взаимосвязи между показателями белков, отражающих состояние ВКМ, и стадией фиброза печени одновременно и на системном, и на локальном уровнях при ХГС. В ходе наших исследований обнаружен дисбаланс содержания протеиназ в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов, который имел различную направленность изменений (рис. 2, 3). Данные нарушения характеризовались следующим образом: сывороточные значения MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-2 по мере трансформации фиброза печени в цирроз (от F0 ст. к F4 ст.) снижались ($p < 0,05$), но при этом концентрация указанных протеолитических ферментов в органе-мишени повышалась ($p < 0,05$). Такие же результаты были получены отечественными и зарубежными авторами, изучающими фиброзные изменения в печени, ассоциированные с HCV-инфекцией [6, 21]. Однако, следует отметить, что имеются научные работы, с которыми наши данные не согласуются [3, 10, 22].

Вопрос о значении системы протеиназ/антипротеиназ в патоиммуноморфогенезе фиброза печени при HCV-инфекции продолжает оставаться дискуссионным. Считается установленным фактом, что матриксные металлопротеиназы продуцируются стромальными клетками, преимущественно клетками трансформированных линий фибробластов, в частности клетками Ито [5, 15, 20]. Под влиянием ряда стимулов,

среди которых существенная роль принадлежит провоспалительным цитокинам, ММР синтезируются и экскретируются первоначально в виде пропептида [9, 10, 13, 19]. Активация ММР происходит в результате протеолитического расщепления предшественника при участии ионов Ca^{2+} или Zn^{2+} [5, 14]. Связывание активированного фермента тканевым ингибитором ведет к образованию латентных форм ММР, которые не способны выполнять свои специфические функции [2, 10, 22]. Подводя итог вышесказанному, можно сделать вывод, что матриксные металлопротеиназы в организме представлены в виде двух форм: проММР (неактивная форма) – нормальный компонент ВКМ, а также реактант острой фазы воспаления; ММР (активная форма) – медиатор, регулирующий состояние межклеточного вещества.

Таким образом, не исключено, что повышенное содержание матриксин в сыворотке крови у пациентов ХГС при отсутствии морфологических изменений в печени по сравнению с аналогичными показателями при выраженных структурных преобразованиях в органе-мишени может являться маркером воспаления. HCV-инфекция сопряжена с гиперпродукцией провоспалительных цитокинов, прежде всего интерлейкина-1 β (IL-1 β), фактора некроза опухоли- α (TNF α) и трансформирующего фактора роста- β (TGF- β) [4, 7, 21]. Последние являются ключевыми индукторами, стимулирующими клетки-мишени к избыточ-

ному синтезу и экскреции острофазных белков организма, включая и неактивные формы MMP. Следовательно, высокие показатели протеиназ в сыворотке крови у пациентов в дебюте патологического процесса, запускаемого вирусом, можно объяснить как одну из составляющих частей первичной реакции иммунного ответа организма при взаимодействии с HCV, несостоятельность которой может способствовать персистенции и хронизации гепатотропной вирусной инфекции. Вышеописанное находит свое подтверждение в работах отечественных и зарубежных авторов, которые отмечают увеличение активности MMP, а также их участие в воспалительном процессе [5, 20].

Что же касается выявленных высоких локальных концентраций MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-2 у пациентов ХГС при выраженной стадии фиброза печени (F3-4 ст.) в сравнении с аналогичными показателями при отсутствии фиброзных изменений в органе-мишени (F0 ст.), то, по нашему мнению, они могут быть связаны с одной из основных функций их в организме. Признано, что матриксные металлопротеиназы — специализированные протеолитические ферменты, которые регулируют состояние ВКМ [1, 9, 14]. Активные формы представителей MMP избирательно расщепляют белки матрикса, в том числе денатурируют фибриллярные коллагены [19]. Следовательно, недостаток протеиназ сопровождается снижением скорости деградации компонентов межклеточного вещества, то есть прогрессированием фиброзных изменений в печени. В нашем исследовании зарегистрированы низкие концентрации MMP-9 и MMP-9/TIMP-2 в сочетании с высокими показателями тканевого ингибитора на локальном уровне у пациентов ХГС относительно группы контроля, что может указывать на нарушение ремоделирования ткани печени.

В то же время формирование фиброза печени при HCV-инфекции и его трансформация в цирроз характеризуется увеличением стромальных клеток — продуцентов матриксина и провоспалительных медиаторов, которые, как упоминалось выше, индуцируют синтез MMP [2, 10, 15, 23]. Следовательно, нарушение архитектоники печеночной ткани сопряжено с избытком протеиназ, а значит, с усилением гидролиза белков ВКМ. Нами обнаружена тенденция к увеличению локального содержания MMP-9 с нарастанием патологического процесса в органе-мишени, однако, она не реализует свой биологический потенциал. В пользу неполноценного функцио-

нирования ее свидетельствует наличие прогрессирующих структурных изменений в печени, несмотря на повышение уровня протеолитического фермента. По-видимому, данный факт связан с тем, что концентрация исследуемого маркера у пациентов ХГС независимо от стадии фиброза печени статистически значимо была снижена по сравнению с аналогичным показателем контрольной группы ($p < 0,05$). Дефицит MMP-9 относительно здоровых лиц, на наш взгляд, может быть обусловлен подавлением ее активности тканевыми ингибиторами, о чем указывает повышенное содержание TIMP-1, а также комплекса MMP-9/TIMP-2, в супернатантах гепатобиоптатов при прогрессировании HCV-ассоциированных морфологических изменений в ткани печени. С другой стороны, низкие показатели MMP-9 в сравнении с контролем, возможно, связаны с избирательной специфичностью представителей матриксных металлопротеиназ. Как отмечено в литературе, MMP-9 расщепляет коллагены IV и V типов, в меньшей степени III [5, 19]. В составе межклеточного вещества при хронических воспалительных заболеваниях печени преобладают коллаген типа I и III, а также фибронектин [10, 14, 15]. Следовательно, субстрат для MMP-9 среди видоизмененных компонентов ВКМ находится в небольшом количестве, а значит, по-видимому, отсутствует необходимость в гиперпродукции изучаемого протеолитического фермента.

Заключение

Обнаружен дисбаланс содержания протеиназ и их комплексов в сыворотке крови и супернатантах гепатобиоптатов, который имел различную направленность изменений: сывороточные значения MMP-9, TIMP-1 и MMP-9/TIMP-2 по мере трансформации фиброза печени в цирроз (от F0 ст. к F4 ст.) снижались, но при этом концентрация указанных протеолитических ферментов в органе-мишени — повышалась. Полученные в ходе нашей работы результаты могут свидетельствовать о влиянии данных показателей на формирование и прогрессирование HCV-ассоциированного фиброза печени. Однако, роль их в ремоделировании печеночной ткани при ХГС остается пока не в полной мере ясной, о чем указывает наличие в современной литературе противоречивых данных, касающихся этого вопроса, что, соответственно, требует дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Бабак О.Я., Колесникова Е.В., Кравченко Н.А. Фиброз печени: современные представления о механизмах, способах диагностики и лечения // *Сучасна гастроентерологія*, 2009. № 2 (46) С. 5-17. [Babak O.Ya., Kolesnikova E.V., Kravchenko N.A. Liver fibrosis: current concepts of mechanisms, diagnostic and therapeutic approaches. *Suchasna gastroenterologiya = Modern Gastroenterology*, 2009, no. 2 (46), pp. 5-17. (In Ukr.)]
2. Вельков В.В. Сывороточные биомаркеры фиброза печени: до свидания, биопсия? М.: Lomonosoff Print, 2009. 40 с. [Vel'kov V.V. Serum biomarkers of liver fibrosis: farewell to the biopsy? Moscow: Lomonosoff Print, 2009. 40 p.]
3. Иванис В.А., Маркелова Е.В., Скляр Л.Ф. Значение иммунных механизмов в патогенезе некоторых острых и хронических вирусных инфекций // *Инфекция и иммунитет*, 2011. Т. 1, № 4. С. 373-377. [Ivanis V.A., Markelova E.V., Sklyar L.F. Significance of immune mechanisms in pathogenesis of some acute and chronic viral infectious diseases. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2011, Vol. 1, no. 4, pp. 373-377. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2011-4-373-377>
4. Нагоев Б.С., Понежева Ж.Б. Роль цитокиновой системы в патогенезе хронического гепатита С // *Инфекционные болезни*, 2009. Т. 7, № 4. С. 12-17. [Nagoev B.S., Ponezheva Zh.B. The role of cytokine system in pathogenesis of chronic hepatitis. *Infektsionnye bolezni = Infectious Diseases*, 2009, Vol. 7, no. 4, pp. 12-17. (In Russ.)]
5. Назаров П.Г. Реактанты острой фазы воспаления. СПб.: Наука, 2001. 423 с. [Nazarov P.G. Acute phase reactants in inflammation]. St. Petersburg: Science, 2001. 423 p.]
6. Останин А.А., Гельфгат Е.Л., Шипунов М.В., Шевела Е.Я., Курганова Е.В., Хван Л.А., Пальцев А.И., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Прогностическая модель неинвазивной диагностики фиброза печени у больных хроническими вирусными гепатитами // *Медицинская иммунология*, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 405-414. [Ostanin A.A., Gelfgadt E.L., Shipunov M.V., Shevela E.Ya., Kurganova E.V., Khvan L.A., Paltsev A.I., Starostina N.M., Chernykh E.R. A predictive model for non-invasive evaluation of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis virus infection. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 10, no. 4-5, pp. 405-414. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2008-4-5-405-414>
7. Сысоев К.А., Чухловин А.Б., Шахманов Д.М., Жданов К.В., Тотолян А.А. Профиль цитокинов и хемокинов в плазме крови пациентов с хроническим гепатитом С // *Инфекция и иммунитет*, 2013. Т. 3, № 1. С. 49-58. [Sysoev K.A., Chukhlov A.V., Shakhmanov D.M., Zhdanov K.V., Totolian A.A. Cytokines and chemokines in the blood plasma of patients with chronic hepatitis C. *Infektsiya i immunitet = Russian Journal of Infection and Immunity*, 2013, Vol. 3, no. 1, pp. 49-58. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2013-1-49-58>
8. Сторожаков Г.И., Ивкова А.Н. Патогенетические аспекты фиброгенеза при хронических заболеваниях печени // *Клинические перспективы гастроэнтерологии, гепатологии*, 2009. № 2. С. 3-10. [Storozhakov G.I., Ivkova A.N. Pathogenetic aspects of fibrogenesis in chronic liver diseases. *Klinicheskie perspektivy gastroenterologii, gepatologii = Clinical Perspectives of Gastroenterology, Hepatology*, 2009, no. 2, pp. 3-10. (In Russ.)]
9. Arthur M.J. Fibrogenesis II. Metalloproteinases and their inhibitors in liver fibrosis. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 2000. Vol. 279, no. 2, pp. 245-249.
10. Baranova A., Lal P., Birerdinc A., Younossi Z.M. Non-Invasive markers for hepatic fibrosis. *BMC Gastroenterol.*, 2011, Vol. 11, no. 91, pp. 1-15.
11. Bataller R., Brenner D. A. Liver fibrosis. *J. Clin. Invest.*, 2005, Vol. 115, no. 2, pp. 209-218.
12. Bruno C.M., Valenti M., Bertino G., Ardiri A., Consolo M., Mazzarino C.M., Amoroso A., Neri S. Altered pattern of circulating matrix metalloproteinases -2, -9 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in patients with HCV-related chronic hepatitis. Relationship to histological features. *Panminerva Med.*, 2009. Vol. 51, no. 4, pp. 191-196.
13. Elkington P.T.G., O'Kane C.M., Friedland J.S. The paradox of matrix metalloproteinases in infectious disease. *Clin. Experiment. Immunol.*, 2005, Vol. 142, no. 1, pp. 12-20.
14. Friedman S.L. Mechanisms of hepatic fibrogenesis. *Gastroenterology*, 2008, Vol. 134, no. 6, pp. 1655-1669.
15. Ghaleb H. A., Salah S. A novel hypothesis for pathophysiology of hepatitis fibrosis in hepatitis C viral infection. *Hypothesis*, 2011, Vol. 9, no. 1, pp. 1-5.
16. Greenbaum L.E., Wells R.G. The role of stem cells in liver repair and fibrosis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2011, Vol. 43, no. 2, pp. 222-229.
17. Jiao J., Friedman S.L., Aloman C. Hepatic fibrosis. *Curr. Opin. Gastroenterol.*, 2009, Vol. 25, no. 3, pp. 223-229.
18. Mormone E., George J., Natalia Nieto N. Molecular pathogenesis of hepatic fibrosis and current therapeutic approaches. *Chem. Biol. Interact.*, 2011, Vol. 193, no. 3, pp. 225-231.
19. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMP. *Cardiovasc. Res.*, 2006, Vol. 69, no. 3, pp. 562-573.

20. Shiomi T., Lemaître V., D'Armiento J., Okada Y. Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases. *Patholog. Int.*, 2010, Vol. 60, no. 7, pp. 477-496.
21. Tarrats N., Moles A., Morales A., García-Ruiz C., Fernández-Checa J.C., Marí M. Critical role of the TNF-receptor 1 but not 2 in hepatic stellate cell proliferation, extracellular matrix remodeling and liver fibrogenesis. *Hepatology*, 2011, Vol. 54, no. 1, pp. 319-327.
22. Valva P., Casciato P., Diaz Carrasco J.M., Gadano A., Galdame O., Galoppo M.C., Mullen E., De Matteo E., Preciado M.V. The role of serum biomarkers in predicting fibrosis progression in pediatric and adult hepatitis C virus chronic infection. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 8, pp. 1-10.
23. Wynn T.A. Cellular and molecular mechanisms of fibrosis. *J. Pathol.*, 2008, Vol. 214, no. 2, pp. 199-210.

Авторы:

Горелова И.С. — к.м.н., ассистент кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Скляр Л.Ф. — д.м.н., доцент, профессор кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Маркелова Е.В. — д.м.н., профессор, заведующая кафедрой нормальной и патологической физиологии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Симакова А.И. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Зенин И.В. — аспирант кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО «Тихоокеанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Gorelova I.S., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Sklyar L.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Markelova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Normal and Pathological Physiology, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Simakova A.I., PhD, MD (Medicine), Associate Professor, Head, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Zenin I.V., Graduate Student, Department of Infectious Diseases, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 11.08.2016
Принята к печати 31.08.2016

Received 11.08.2016
Accepted 31.08.2016

ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ

Савченко А.А.^{1,2}, Борисов А.Г.^{1,2}, Здзитовецкий Д.Э.²,
Кудрявцев И.В.^{3,4,6}, Медведев А.Ю.⁵, Мошев А.В.¹, Гвоздев И.И.¹

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

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

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

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

⁵ КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

⁶ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Целью исследования явилось изучение особенностей субпопуляционного состава и функциональной активности моноцитов у больных острым панкреатитом. Обследовано 33 больных острым панкреатитом средней и тяжелой степени тяжести. В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона. Исследование фенотипа моноцитов крови проводили методом проточной цитометрии. Уровень фагоцитоза моноцитов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченного стафилококкового белка А. Подсчитывали процент флуоресцирующих моноцитов (определяли как фагоцитарный индекс) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число). Показатели фагоцитоза определяли как в общей фракции моноцитов, так и в отдельных субпопуляциях (CD14⁺CD16⁻, CD14^{dim}CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺). Состояние респираторного взрыва моноцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа. Использовали два индикатора (люцигенин и люминол) для оценки уровня синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода. У больных острым панкреатитом установлены изменения в субпопуляционном составе моноцитов в крови и их функциональной активности. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов при остром панкреатите определяются увеличением количества провоспалительных клеток в крови (CD14^{low}CD16⁺) при сохранении содержания «классических» (CD14⁺CD16⁻) и «неклассических» (CD14^{dim}CD16⁺) фракций на уровне контрольного диапазона. Предполагается, что высокое содержание провоспалительных моноцитов формирует патогенетическое «кольцо», характеризующее положительную взаимную стимуляцию местного (в ткани поджелудочной железы) и системного (за счет моноцитов крови) воспаления. По-видимому, именно формирование подобного взаимного стимулирования воспалительных процессов и определяет низкую эффективность противовоспалительной терапии острого панкреатита. Особенности функциональной активности моноцитов у больных острым панкреатитом характеризуются снижением фагоцитарной активности и снижением ин-

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

А.А. Савченко, А.Г. Борисов, Д.Э. Здзитовецкий,
И.В. Кудрявцев, А.Ю. Медведев, А.В. Мошев, И.И. Гвоздев
«Фенотипический состав и функциональная активность
моноцитов у больных острым панкреатитом»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 45–54.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-45-54

© Савченко А.А. и соавт., 2017

For citation:

A.A. Savchenko, A.G. Borisov, D.E. Zdzitovetskiy, I.V. Kudryavtsev,
A.Yu. Medvedev, A.V. Moshev, I.I. Gvozdev "Phenotypic profile
and functional activity of monocytes in the patients with acute
pancreatitis", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 45–54.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-45-54

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-45-54>

тенсивности респираторного взрыва. Снижение фагоцитарной активности моноцитов выявляется для всех субпопуляций клеток. Понижение интенсивности респираторного взрыва моноцитов при остром панкреатите определяется низким фоновым и индуцированным синтезом первичных и вторичных активных форм кислорода. При этом у больных острым панкреатитом выявляется дисбаланс в метаболических резервах моноцитов для синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода, который может формироваться как за счет патологического влияния на клетки высокого уровня панкреатических ферментов в крови, так и за счет повышения концентрации провоспалительных цитокинов. Субпопуляционный дисбаланс моноцитов и снижение их функциональной активности при остром панкреатите может являться иммунопатогенетической основой для развития панкреонекроза и сепсиса.

Ключевые слова: перитонит, динамика послеоперационного периода, нейтрофилы, фагоцитоз, респираторный взрыв, активные формы кислорода

PHENOTYPIC PROFILE AND FUNCTIONAL ACTIVITY OF MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS

Savchenko A.A.^{a, b}, Borisov A.G.^{a, b}, Zdzitovetskiy D.E.^b,
Kudryavtsev I.V.^{c, d, f}, Medvedev A.Yu.^e, Moshev A.V.^a, Gvozdev I.I.^a

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

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

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

^d Far Eastern Federal University, Krasnoyarsk, Russian Federation

^e N.S. Karpovich Inter-district Critical Care Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Abstract. The aim of this study was to evaluate some features of subpopulational profile and functional activity of monocytes in patients with acute pancreatitis. The study included 33 subjects with acute pancreatitis of middle-to-severe degree. Thirty-five healthy age-matched people served as a control group. The study of monocyte phenotype was performed by flow cytometry. Phagocytic ability of monocytes was determined by flow cytometry, by means of FITC-labeled staphylococcal protein A. We assessed percentage of fluorescent monocytes (defined as phagocytic index), like as average cell fluorescence (phagocytic number). The phagocytic indexes were determined for a total monocyte fraction, and well as for distinct cell subpopulations (CD14⁺CD16⁻, CD14^{dim}CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺). Intensity of respiratory burst in the monocytes was evaluated with chemiluminescence analysis. We used two indicators (lucigenin and luminol) to assess production of primary and secondary reactive oxygen species. In the patients with acute pancreatitis, we have found certain changes in blood monocyte subpopulations and their functional activity. The changes in monocyte subpopulations in acute pancreatitis were characterized by increased numbers of inflammatory cell forms in blood (CD14^{low}CD16⁺), along with while near-normal contents of the cells with «classic» (CD14⁺CD16⁻) and «non-classical» phenotype (CD14^{dim}CD16⁺), having been within reference ranges. It is assumed that high levels of pro-inflammatory monocytes may produce a pathogenetic «circuit» which is characterized by positive mutual stimulation of monocyte-mediated inflammation in local (pancreatic) and blood compartments. Apparent development of such mutual induction of inflammatory events may determine a low efficiency of anti-inflammatory therapy in acute pancreatitis. The functional characteristics of the monocytes in patients with acute pancreatitis are defined as a decrease in phagocytic activity and low respiratory burst intensity. Reduced phagocytic activity of monocytes was detectable in all the cellular subpopulations. Decreased intensity of monocytic respiratory burst in acute pancreatitis depends on low background and induced synthesis of both primary and secondary reactive oxygen species. Thus the patients with acute pancreatitis exhibit imbalanced with respect to synthesis of primary and secondary reactive oxygen species in the monocytes may result from specific action of circulating pancreatic enzymes upon the cells, or due to increased concentrations of pro-inflammatory cytokines. The imbalance between the monocyte subpopulations and reduction of their functional activity in acute pancreatitis may represent an immunopathogenetic basis for development of pancreatic necrosis and sepsis.

Keywords: peritonitis, post-surgical period, neutrophils, phagocytosis, respiratory burst, reactive oxygen species

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

Введение

На сегодняшний день острый панкреатит (ОП) входит в число наиболее часто встречающихся острых хирургических заболеваний органов брюшной полости и составляет в структуре «острого живота» 28-45% [1, 13]. Летальность от деструктивного панкреатита (панкреонекроз), который является наиболее тяжелой формой ОП, уже длительное время не меняется и составляет 18-25% [2, 21]. При этом панкреонекроз является достаточно распространенной патологией — в странах Европы он развивается у 15-20%, а в России, по разным данным, — у 25-44% пациентов с ОП [1, 13, 21]. Все это определяет необходимость поиска новых, более эффективных, патогенетически ориентированных методов лечения ОП.

При ОП запускается каскад воспалительных реакций, затрагивающий все системы, приводящий к значительным сдвигам в гомеостазе, развитию системного воспаления и к полиорганной недостаточности [1, 20, 23]. Одной из клеточных популяций, принимающих активное участие в воспалении, являются моноциты. Необходимо отметить, что моноциты, с одной стороны, играют ведущую роль в реализации реакций врожденного иммунитета (фагоцитоз, продукция активных форм кислорода, выделение медиаторов, дифференцировка в макрофаги), с другой стороны — в регуляции и запуске реакций адаптивного иммунитета (за счет синтеза иммунорегуляторных цитокинов и в качестве антигенпрезентирующих клеток) [3, 6, 16].

Моноциты крови долгое время рассматривались в качестве единой группы клеток. Однако на основании функциональной активности и экспрессии некоторых поверхностных антигенов подразделяются на несколько различных популяций [3, 6, 9]. Так, по уровням экспрессии рецепторного комплекса для бактериального липопосахарида CD14 и высокоаффинного рецептора Fcγ CD16 циркулирующие моноциты можно разделять как минимум на две популяции. Клетки, экспрессирующие только CD14, принято называть «классическими моноцитами». Это фракция активно фагоцитирующих клеток, в норме они составляют до 95% от общего числа циркулирующих моноцитов. Моноциты, об-

ладающие фенотипом CD14^{low}CD16⁺, определяются как «неклассические» [15, 26]. Увеличение количества последних имеет место при различных патологических процессах, включая сепсис, острые и хронические воспалительные заболевания вирусной и бактериальной этиологии и т.д. В ряде случаев выделяют дополнительную группу моноцитов с фенотипом CD14^{dim}CD16⁺ или CD14⁺⁺CD16⁺, которые принято называть «промежуточными» [15].

Среди функциональных проявлений моноцитов, важную роль играет респираторный взрыв, который реализуется в виде синтеза первичных и вторичных активных форм кислорода (АФК) и развивается при взаимодействии клеток с объектом фагоцитоза [6, 9, 18]. Обсуждается значение синтеза ряда АФК в системе внешнего киллинга.

Важную роль в патогенезе ОП играют ферменты поджелудочной железы, попавшие в кровь и токсически воздействующие на клетки [1, 13, 20]. Подобное воздействие на моноциты может привести к изменению их функциональной активности, что, соответственно, повлияет на течение воспалительной реакции и клиническое состояние больных.

Таким образом, целью исследования явилось изучение особенностей субпопуляционного состава и функциональной активности моноцитов у больных ОП.

Материалы и методы

Под наблюдением находилось 33 больных ОП (19 мужчин и 14 женщин) средней и тяжелой степени тяжести, проходивших лечение в отделениях хирургии и отделении реанимации и интенсивной терапии КБУЗ «КМКБСМП им. Н.С. Карповича» г. Красноярск. Средний возраст больных составил $46,8 \pm 6,4$ года. Из исследования были исключены больные с ОП легкой степени и те, у которых ОП явился осложнением травмы брюшной полости, в том числе и послеоперационный. Исходную степень тяжести состояния больных определяли по шкале SAPS II [17]. Для оценки тяжести ОП и прогноза развития заболевания применяли шкалу критериев первичной экспресс-оценки тяжести острого панкреатита Санкт-Петербургского НИИ скорой помощи имени И.И. Джанелидзе [1]. Наличие и степень выраженности полиорганной недостаточности исходно и в динамике определяли по шкале SOFA [24]. При оценке степени тяжести синдрома системной воспалительной реакции придерживались критериев ACCP/SCCM [11].

В качестве контроля обследовано 35 здоровых людей аналогичного возрастного диапазона.

Исследование фенотипа моноцитов крови проводили методом проточной цитометрии с использованием прямой иммунофлуоресценции цельной периферической крови с использованием моноклональных антител (Beckman Coulter, USA), меченных PE или RD1 (phycoerythrin), ECD (phycoerythrin-Texas Red-X), PC5 (phycoerythrin-cyanin 5) и PC7 (phycoerythrin-cyanin 7) в следующей панели: CD14-PE/CD45-ECD/HLA-DR-PC5/CD16-PC7. Распределение антител по каналам флуоресценции проводили в соответствии с принципами формирования панелей для многоцветных цитофлуориметрических исследований [4]. Подготовку образцов периферической крови для анализа осуществляли по стандартной методике [7]. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре FC-500 (Beckman Coulter, USA) [19]. В каждой пробе анализировали не менее 50000 моноцитов.

Уровень фагоцитоза моноцитов определяли методом проточной цитометрии с помощью FITC-меченного (fluorescein isothiocyanate) стафилококкового белка А [5]. Конъюгацию выполняли следующим образом: к стафилококковому белку А (разведен в бикарбонатном буфере, рН = 9,0) добавляли FITC (предварительно растворяли в ДМСО до концентрации 1 мкг/мл), инкубировали в темноте в течение 1 часа, трижды отмывали и по стандарту мутности доводили концентрацию белка до 1 млн/мл. К 100 мкл гепаринизированной крови добавляли 10 мкл FITC-меченного белка А и инкубировали 30 минут при температуре 37 °С. Лизис эритроцитов проводили по безотмывочной технологии с использованием реагента VersaLyse (Beckman Coulter, США). Для гашения адгезированного на поверхности моноцитов FITC-меченного белка А к суспензии клеток добавляли раствор трипанового синего (0,2 мг/мл). Анализ окрашенных клеток проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (BeckmanCoulter, USA). В каждой пробе анализировали не менее 50000 моноцитов. Подсчитывали процент флуоресцирующих моноцитов (определяли как фагоцитарный индекс – ФИ) и средний уровень флуоресценции клеток (фагоцитарное число – ФЧ). Показатели фагоцитоза определяли как в общей фракции моноцитов, так и в отдельных субпопуляциях (CD14⁺CD16⁻, CD14^{dim}CD16⁺ и CD14^{low}CD16⁺).

Моноциты периферической крови получали стандартным методом адгезии к плоским поверхностям из мононуклеарных клеток, выделенных из гепаринизированной венозной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-урографина ($\rho = 1,077$) [14]. Состояние респираторного взрыва моноцитов исследовали с помощью хемилюминесцентного анализа [8]. В качестве индикаторов хемилюминесценции использовали люминол и люцигенин. Оценка спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции осуществлялась в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе CL3606 (Россия). Определяли следующие характеристики: время выхода на максимум (Tmax), максимальное значение интенсивности (Imax), а также площадь под кривой (S) хемилюминесценции. Усиление хемилюминесценции, индуцированной зимозаном, оценивали отношением площади индуцированной хемилюминесценции (Синд.) к площади спонтанной (Сспонт.) и определяли как индекс активации (Синд./Сспонт.).

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

Описание выборки производили с помощью подсчета медианы (Me) и интерквартильного размаха в виде 1 и 3 квартилей ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Достоверность различий между показателями независимых выборок оценивали по непараметрическому критерию Манна–Уитни. Статистический анализ осуществляли в пакете прикладных программ Statistica 8.0 (StatSoft Inc., 2007).

Результаты

При исследовании содержания и цитометрической оценки субпопуляционного состава моноцитов в крови у больных ОП обнаружено, что у обследуемых пациентов относительно контрольных значений снижено процентное количество, но повышено абсолютное содержание общих моноцитов (табл. 1). Такая особенность соотношения процентного и абсолютного уровня клеток связана со значительным повышением количества лейкоцитов в периферической крови у больных ($Me = 16,00 \times 10^9/л$, $Q_{0,25} = 12,10 \times 10^9/л$ и $Q_{0,75} = 19,40 \times 10^9/л$) относительно контрольного

диапазона ($Me = 5,75 \times 10^9/\text{л}$, $Q_{0,25} = 4,78 \times 10^9/\text{л}$ и $Q_{0,75} = 7,20 \times 10^9/\text{л}$). У больных ОП повышено абсолютный уровень моноцитов с фенотипом $CD14^+CD16^-$, а также относительное и абсолютное содержание клеток с фенотипом $CD14^{\text{dim}}CD16^+$.

Исследование фагоцитарной активности позволило установить, что у больных ОП относительно контрольных значений значительно снижено ФИ общей фракции моноцитов (см. табл. 1). Также обнаружено, что у обследованных пациентов ФИ снижен у моноцитов с фенотипом $CD14^+CD16^-$ (в 2,3 раза по сравнению с контролем) и $CD14^{\text{dim}}CD16^+$ (в 2,5 раза), тогда как у фракции моноцитов с фенотипом $CD14^{\text{low}}CD16^+$

снижена величина и ФИ (в 2,1 раза) и ФЧ (в 2,7 раза).

При исследовании активности люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов установлено, что у больных ОП снижены максимумы интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции по сравнению с показателями контрольной группы (табл. 2). Причем снижение показателей относительно нормы индуцированной хемилюминесценции более выражено, чем спонтанной, что приводит к понижению у обследованных пациентов индекса активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов.

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИПИЧЕСКИЙ СОСТАВ И ПОКАЗАТЕЛИ ФАГОЦИТОЗА МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. PHENOTYPIC PROFILE AND PHAGOCYTOSIS IN PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS, MEDIAN VALUES ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль, n = 35 Control	Острый панкреатит, n = 33 Acute pancreatitis	p
Моноциты Monocytes, %	6,00 (4,0-8,0)	4,4 (2,2-6,9)	0,048
Моноциты Monocytes, $10^9/\text{л}$	0,35 (0,18-0,51)	0,45 (0,29-0,79)	0,017
$CD14^+CD16^-$, %	75,8 (66,3-85,8)	73,6 (58,1-86,5)	
$CD14^+CD16^-$, $10^9/\text{л}$	0,27 (0,12-0,44)	0,40 (0,22-1,33)	< 0,001
$CD14^{\text{dim}}CD16^+$, %	8,7 (4,1-14,4)	17,0 (11,3-23,5)	< 0,001
$CD14^{\text{dim}}CD16^+$, $10^9/\text{л}$	0,03 (0,01-0,07)	0,08 (0,05-0,17)	0,008
$CD14^{\text{low}}CD16^+$, %	3,8 (2,5-6,0)	3,1 (1,0-8,9)	
$CD14^{\text{low}}CD16^+$, $10^9/\text{л}$	0,01 (0,005-0,03)	0,01 (0,005-0,01)	
ФИ моноцитов Phl (monocytes), %	40,26 (11,77-83,11)	8,68 (5,82-12,13)	< 0,001
ФЧ моноцитов Phagoc. number (monocytes)	65,5 (24,8-103,0)	93,8 (37,6-99,1)	
ФИ $CD14^+CD16^-$ Phl $CD14^+CD16^-$, %	12,50 (4,54-26,50)	5,36 (3,46-9,48)	0,039
ФЧ $CD14^+CD16^-$ Phagoc. number $CD14^+CD16^-$	55,1 (39,9-80,5)	65,5 (52,0-68,7)	
ФИ $CD14^{\text{dim}}CD16^+$ Phl $CD14^{\text{dim}}CD16^+$, %	37,50 (14,28-50,71)	15,00 (11,11-24,71)	0,026
ФЧ $CD14^{\text{dim}}CD16^+$ Phagoc. number $CD14^{\text{dim}}CD16^+$	175,0 (43,9-342,0)	112,0 (52,2-250,0)	
ФИ $CD14^{\text{low}}CD16^+$ Phl $CD14^{\text{low}}CD16^+$, %	30,76 (15,94-40,00)	14,28 (8,33-33,33)	0,038
ФЧ $CD14^{\text{low}}CD16^+$ Phagoc. number $CD14^{\text{low}}CD16^+$	32,6 (21,6-175,0)	12,0 (7,8-36,4)	0,016

Note: Phl, phagocytic index.

ТАБЛИЦА 2. ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНАЯ АКТИВНОСТЬ МОНОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ОСТРЫМ ПАНКРЕАТИТОМ,

Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CHEMILUMINESCENCE OF MONOCYTES IN THE PATIENTS WITH ACUTE PANCREATITIS, MEDIAN VALUES ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Parameters	Контроль, n = 35 Control	Острый панкреатит, n = 33 Acute pancreatitis	p
Спонтанная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Spontaneous lucigenin-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	2014 (1452-2604)	3359 (935-4853)	
Imax, OE $\times 10^3$	0,67 (0,40-1,51)	0,32 (0,26-0,39)	0,003
S, OE $\times$ sec. $\times 10^5$	0,79 (0,49-1,95)	0,19 (0,14-0,45)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люцигенин-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced lucigenin-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	1835 (1576-2842)	1480 (905-2896)	
Imax, OE $\times 10^3$	2,89 (1,12-9,42)	0,50 (0,37-1,05)	< 0,001
S, OE $\times$ sec $\times 10^5$	4,23 (1,14-12,37)	0,34 (0,21-0,93)	< 0,001
Синд./ Спонт. S induced/ S spont	3,61 (1,65-8,03)	1,50 (1,10-3,05)	0,013
Спонтанная люминол-зависимая хемилюминесценция Spontaneous luminol-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	1810 (660-2575)	711 (244-4892)	
Imax, OE $\times 10^3$	6,29 (1,52-15,10)	0,33 (0,28-0,42)	< 0,001
S, OE $\times$ sec $\times 10^5$	6,89 (1,70-13,21)	0,21 (0,15-0,39)	< 0,001
Зимозан-индуцированная люминол-зависимая хемилюминесценция Zymosan-induced luminol-dependent chemiluminescence			
Tmax, sec	1150 (973-1808)	979 (631-1561)	
Imax, OE $\times 10^3$	11,60 (5,85-45,20)	3,13 (0,84-13,43)	0,042
S, OE $\times$ csec $\times 10^5$	11,53 (4,49-39,86)	2,21 (0,53-5,82)	0,006
Синд./ Спонт. S induced/ S spont	2,89 (1,72-3,80)	4,51 (2,18-19,64)	0,037

Исследование параметров респираторного взрыва моноцитов с помощью люминол-зависимой хемилюминесценции позволило установить, что у больных ОП относительно показателей контрольной группы снижаются максимумы интенсивности и площади под кривой спонтанной и зимозан-индуцированной хемилюминесценции. Однако, в данном случае показатели спонтанной хемилюминесценции понижены более выражено относительно контрольных значений, чем показатели индуцированной, что привело к увеличению величины индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов у больных ОП.

Обсуждение

Воспалительная реакция у больных ОП характеризуется снижением процентного содержания моноцитов и увеличением их абсолютного количества за счет значительного выброса лейкоцитов. Функциональные особенности моноцитов в значительной степени определяются их субпопуляционным составом. Так, «классические» моноциты ($CD14^+CD16^-$) являются эффекторными клетками с высоким уровнем фагоцитоза и низким уровнем синтеза провоспалительных цитокинов (фактор некроза опухоли- α и интерлейкин-1) [3, 9]. Именно для этих клеток характерна высокая активность респираторного взрыва [6].

«Неклассические» моноциты ($CD14^{low}CD16^{+}$) являются небольшими по размеру клетками с низким уровнем фагоцитарной и оксидазной активности, что также сочетается с пониженной интенсивностью респираторного взрыва. На их поверхности экспрессированы молекулы CX3CR1, CD11c и HLA-DR, что позволяет им активно мигрировать через эндотелий и дифференцироваться в макрофаги и дендритные клетки [15, 26]. Субпопуляция «промежуточных» моноцитов с фенотипом $CD14^{dim}CD16^{+}$ за счет активной продукции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-1, IL-6) определяется как провоспалительная [15].

В периферической крови больных ОП выявляется увеличение абсолютного содержания «классических» моноцитов, что, безусловно, связано с выбросом лейкоцитов в кровь при воспалительной реакции и соответствующим повышением абсолютного уровня общей фракции моноцитов. Содержание «неклассических» моноцитов сохраняется на уровне контрольного диапазона. Однако повышено количество «промежуточной» фракции моноцитов с провоспалительной функцией. Необходимо отметить, что важную роль в патогенезе ОП играет активация генов TNF α , IL-6, IL-8 и фактора активации тромбоцитов в ацинарных клетках поджелудочной железы [12, 22, 25]. В течение нескольких часов концентрация данных цитокинов в ткани поджелудочной железы возрастает, что определяет приток активированных клеток врожденного иммунитета и соответствующую стимуляцию воспаления. В связи с этим повышение количества провоспалительных моноцитов формирует патогенетическое «кольцо», которое определяет положительную взаимостимуляцию местного и системного воспаления при ОП: секреция провоспалительных цитокинов в ацинарных клетках поджелудочной железы стимулирует развитие местной воспалительной реакции, а также повышение количества провоспалительных моноцитов в крови, которые синтезируют провоспалительные цитокины и, соответственно, стимулируют активность системного и местного воспаления.

Выход в кровь панкреатических ферментов, безусловно, не может не повлиять на функциональную активность клеток, в том числе и на моноциты. Обнаружено, что при ОП снижен процент фагоцитирующих моноцитов в крови (ФИ). При этом выявляется снижение ФИ по всем субпопуляциям моноцитов. Причем для фракции $CD14^{+}CD16^{-}$ моноцитов характерно наиболее выраженное снижение уровня фагоцитирующих

клеток (в 4,6 раза по сравнению с контрольным уровнем). Тогда как количество фагоцитирующих $CD14^{dim}CD16^{+}$ моноцитов снижается в 2,5 раза, а $CD14^{low}CD16^{+}$ клеток — в 2,2 раза. При этом именно у провоспалительных моноцитов снижается и ФЧ, что указывает на снижение фагоцитарной активности самих моноцитов с фенотипом $CD14^{low}CD16^{+}$.

Другим проявлением функциональной активности моноцитов является респираторный взрыв. Интенсивность респираторного взрыва исследована с помощью двух хемилюминесцентных индикаторов: люцигенина и люминола. Люцигенин окисляется и люминесцирует только под влиянием супероксид-радикала, который определяется как первичная АФК и синтезируется в системе НАДФН-оксидазы [6, 8, 10]. Необходимо также отметить, что люцигенин не проникает через клеточные мембраны. Соответственно, исследование люцигенин-зависимой хемилюминесценции моноцитов позволяет охарактеризовать состояние активности НАДФН-оксидазы цитоплазматической мембраны моноцитов. Обнаружено, что у больных ОП снижена фоновая и индуцированная интенсивность синтеза первичных АФК моноцитами крови. Причем индукция респираторного взрыва зимозаном не привела к повышению уровня синтеза первичных АФК, что отразилось на снижении величины индекса активации люцигенин-зависимой хемилюминесценции.

Цитотоксическая активность моноцитов определяется уровнем продукции как первичных, так и вторичных АФК (гидроксильный радикал, перекись водорода и др.). В формировании пула вторичных АФК принимают участие такие ферменты, как супероксиддисмутаза, каталаза, миелопероксидаза и др. Люминол способен вступать в хемилюминесцентную реакцию как с первичными, так и с вторичными АФК, хорошо проникает через различные клеточные мембраны, в том числе и лизосомальные [6, 8, 10]. У больных ОП выявляется снижение спонтанного и индуцированного уровня синтеза вторичных АФК, но с увеличением величины индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции.

Индекс активации характеризует уровень метаболических резервов для реакций синтеза соответствующих АФК. Снижение данного показателя при синтезе первичных АФК моноцитами крови у больных ОП определяется понижением уровня наработки НАДФН в клетках, что, прежде всего, может быть связано с ингибированием пентозофосфатного цикла (основного внутриклеточного процесса синтеза НАДФН).

В то же время повышение величины индекса активации люминол-зависимой хемилюминесценции моноцитов у больных ОП определяется индуцированной активацией ферментов синтеза вторичных АФК, прежде всего, в лизосомах клеток. Подобный дисбаланс может определяться как нарушениями физиологии моноцитов при ОП за счет высокой концентрации панкреатических ферментов в крови, так и регуляторными процессами, а именно высоким уровнем провоспалительных цитокинов [1, 13, 20].

Таким образом, у больных ОП установлены изменения в субпопуляционном составе моноцитов в крови и их функциональной активности. Изменения в субпопуляционном составе моноцитов при ОП определяются увеличением количества провоспалительных клеток в крови при сохранении содержания «классических» и «неклассических» фракций на уровне контрольного диапазона. Предполагается, что высокое содержание провоспалительных моноцитов формирует патогенетическое «кольцо», характеризующее положительную взаимную стимуляцию местного (в ткани поджелудочной железы) и системного (за счет моноцитов крови) воспаления. По-

видимому, именно формирование подобного взаимного стимулирования воспалительных процессов и определяет низкую эффективность противовоспалительной терапии ОП. Особенности функциональной активности моноцитов у больных ОП характеризуются снижением фагоцитарной активности и снижением интенсивности респираторного взрыва. Снижение фагоцитарной активности моноцитов выявляется для всех субпопуляций клеток. Понижение интенсивности респираторного взрыва моноцитов при ОП определяется низким фоновым и индуцированным синтезом первичных и вторичных АФК. При этом у больных ОП выявляется дисбаланс в метаболических резервах моноцитов для синтеза первичных и вторичных АФК, который может формироваться как за счет патологического влияния на клетки высокого уровня панкреатических ферментов в крови, так и за счет повышения концентрации провоспалительных цитокинов. Субпопуляционный дисбаланс моноцитов и снижение их функциональной активности при ОП может являться иммунопатогенетической основой для развития панкреонекроза и сепсиса.

Список литературы / References

1. Багненко С.Ф., Толстой А.Д., Краснорогов В.Б., Курыгин А.А., Гринев М.В., Лапшин В.Н., Гольцов В.Р. Острый панкреатит (Протоколы диагностики и лечение) // *Анналы хирургической гепатологии*, 2006. Т. 11, № 1. С. 60-66. [Bagnenko S.F., Tolstoy A.D., Krasnorogov V.B., Kurygin A.A., Grinev M.V., Lapshin V.N., Gol'tsov V.R. Acute pancreatitis (diagnostic protocols and treatment). *Annaly khirurgicheskoy gepatologii = Annals of Surgical Hepatology*, 2006, Vol. 11, no. 1, pp. 60-66. (In Russ.)]
2. Багненко С.Ф., Гольцов В.Р., Савелло В.Е., Вашетко Р.В. Классификация острого панкреатита: современное состояние проблемы // *Вестник хирургии им. И.И. Грекова*, 2015. Т. 174, № 5. С. 86-92. [Bagnenko S.F., Gol'tsov V.R., Savello V.E., Vashetko R.V. Classification of acute pancreatitis: modern state of the problem. *Vestnik khirurgii im. I.I. Grekova = Grekov Clinical Surgery Bulletin*, 2015, Vol. 174, no. 5, pp. 86-92. (In Russ.)]
3. Головкин А.С., Матвеева В.Г., Кудрявцев И.В., Григорьев Е.В., Великанова Е.А., Байракова Ю.В. Субпопуляции моноцитов крови при неосложненном течении периоперационного периода коронарного шунтирования // *Медицинская иммунология*, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 305-312. [Golovkin A.S., Matveeva V.G., Kudryavtsev I.V., Grigoriev E.V., Velikanova E.A., Bairakova Y.V. Blood monocyte subpopulations during uncomplicated coronary artery bypass surgery. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 305-312. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-4-5-305-312>
4. Кудрявцев И.В., Субботовская А.И. Опыт измерения параметров иммунного статуса с использованием шестичетного цитофлуориметрического анализа // *Медицинская иммунология*, 2015. Т. 17, № 1. С. 19-26. [Kudryavtsev I.V., Subbotovskaya A.I. Application of six-color flow cytometric analysis for immune profile monitoring. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 19-26. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-1-19-26>
5. Мазуров Д.В., Пинегин Б.В. Применение проточной цитометрии для оценки поглотительной и бактерицидной функций гранулоцитов и моноцитов периферической крови // *Аллергия, астма и клиническая иммунология*, 1999. № 9. С. 154-156. [Mazurov D.V., Pinegin B.V. Application of flow cytometry for evaluating the absorbency and the antibacterial functions of granulocytes and monocytes of peripheral blood. *Allergiya, astma i klinicheskaya immunologiya = Allergy, Asthma and Clinical Immunology*, 1999, no. 9, pp. 154-156. (In Russ.)]

6. Савченко А.А., Борисов А.Г., Модестов А.А., Мошев А.В., Кудрявцев И.В., Тоначева О.Г., Кошечев В.Н. Фенотипический состав и хемилюминесцентная активность моноцитов у больных почечно-клеточным раком // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 2. С. 141-150. [Savchenko A.A., Borisov A.G., Modestov A.A., Moshev A.V., Kudryavtsev I.V., Tonacheva O.G., Koshcheev V.N. Monocytes subpopulations and chemiluminescent activity in patients with renal cell carcinoma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 2, pp. 141-150. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2015-2-141-150>
7. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлюориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012, Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology «Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers» (Draft). *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2012-3-255-268>
8. Шкапова Е.А., Куртасова Л.М., Савченко А.А. Показатели люцигенин- и люминол-зависимой 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. The indicators of the lucigenin- and luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils by the patients with kidney cancer. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, Vol. 149, no. 2, pp. 201-203. (In Russ.)]
9. Appleby L.J., Nausch N., Midzi N., Mduluzi T., Allen J.E., Mutapi F. Sources of heterogeneity in human monocyte subsets. *Immunol. Lett.*, 2013, Vol. 152, no. 1, pp. 32-41.
10. Benbarek H., Ayad A., Deby-Dupont G., Boukraa L., Serateyn 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.
11. Bone R.S., Balk R.A., Cerra F.B., Dellinger R.P., Fein A.M., Knaus W.A., Schein R.M., Sibbald W.J. American college of Chest Physicians. Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: Definitions for sepsis and organ failure and guide lines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.*, 1992, Vol. 20, no. 6, pp. 864-874.
12. Cen Y., Liu C., Li X., Yan Z., Kuang M., Su Y., Pan X., Qin R., Liu X., Zheng J., Zhou H. Artesunate ameliorates severe acute pancreatitis (SAP) in rats by inhibiting expression of pro-inflammatory cytokines and Toll-like receptor 4. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, Vol. 38, pp. 252-260.
13. Choi S.B., Bae G.S., Jo I.J., Wang S., Song H.J., Park S.J. Berberine inhibits inflammatory mediators and attenuates acute pancreatitis through deactivation of JNK signaling pathways. *Mol. Immunol.*, 2016, Vol. 74, pp. 27-38.
14. Gordon S. Targeting a monocyte subset to reduce inflammation. *Circ. Res.*, 2012, Vol. 110, no. 12, pp. 1546-1548.
15. Hristov M., Schmitz S., Nauwelaers F., Weber C. A flow cytometric protocol for enumeration of endothelial progenitor cells and monocyte subsets in human blood. *J. Immunol. Methods*, 2012, Vol. 381, no. 1-2, pp. 9-13.
16. Lauvau G., Loke P., Hohl T.M. Monocyte-mediated defense against bacteria, fungi, and parasites. *Semin. Immunol.*, 2015, Vol. 27, no. 6, pp. 397-409.
17. Le Gall J.-R., Lemeshow S., Saulnier F. A new Simplified Acute Physiology Score (SAPS II) based on a European/North American multicenter study. *JAMA*, 1993, Vol. 270, pp. 2957-2963.
18. Lundberg S., Lundahl J., Gunnarsson I., Jacobson S.H. Atorvastatin-induced modulation of monocyte respiratory burst *in vivo* in patients with IgA nephropathy: a chronic inflammatory kidney disease. *Clin. Nephrol.*, 2010, Vol. 73, no. 3, pp. 221-228.
19. Maecker H., McCoy P., Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the human immunology project. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, pp. 191-200.
20. Maheshwari R., Subramanian R.M. Severe Acute Pancreatitis and Necrotizing Pancreatitis. *Crit. Care Clin.*, 2016, Vol. 32, no. 2, pp. 279-290.
21. Sato K., Monden K., Ueki T., Tatsukawa M., Sadamori H., Sakaguchi K., Takakura N. A case of pancreatic arteriovenous malformation identified by investigating the cause of upper abdominal pain associated with acute pancreatitis. *Nihon Shokakibyo Gakkai Zasshi*, 2016, Vol. 113, no. 7, pp. 1223-1229.

22. Schmidt A.I., Seifert G.J., Lauch R., Wolff-Vorbeck G., Chikhladze S., Hopt U.T., Wittel U.A. Organ-specific monocyte activation in necrotizing pancreatitis in mice. *J. Surg. Res.*, 2015, Vol. 197, no. 2, pp. 374-381.
23. Singh P., Garg P.K. Pathophysiological mechanisms in acute pancreatitis: Current understanding. *Indian J. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 35, no. 3, pp. 153-166.
24. Vincent J.L., Moreno R., Takala J., Willatts S., De Mendonca A., Bruining H., Reinhart C.K., Suter P.M., Thijs L.G. The SOFA (Sepsis-related Organ Failure Assessment) score to describe organ dysfunction/failure. On behalf of the Working Group on Sepsis-Related Problems of the European Society of Intensive Care Medicine. *Intensive Care Med.*, 1996, Vol. 22, no. 7, pp. 707-710.
25. Yang Z.W., Meng X.X., Xu P. Central role of neutrophil in the pathogenesis of severe acute pancreatitis. *J. Cell Mol. Med.*, 2015, Vol. 19, no. 11, pp. 2513-2520.
26. Ziegler-Heitbrock L. Monocyte subsets in man and other species. *Cell Immunol.*, 2014, Vol. 289, no. 1-2, pp. 135-139.

Авторы:

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

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

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

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

Медведев А.Ю. — врач КГБУЗ «Красноярская межрайонная клиническая больница скорой медицинской помощи имени Н.С. Карповича», г. Красноярск, Россия

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

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

Authors:

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

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

Zdzitovetskiy D.E., PhD, MD (Medicine), Head, M.Yu. Lubensky Department of Surgical Diseases, V.F. Voyno-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Medvedev A.Yu., Clinical Doctor, N.S. Karpovich Inter-district Critical Care Hospital, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

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

Поступила 26.07.2016
Принята к печати 29.08.2016

Received 26.07.2016
Accepted 29.08.2016

ВЗАИМОСВЯЗЬ УРОВНЕЙ НЕОПТЕРИНА И $IFN\gamma$ У ПАЦИЕНТОВ С ОБОСТРЕНИЕМ ХРОНИЧЕСКОГО ПЕРИОДОНТИТА И НЕПЕРЕНОСИМОСТЬЮ СТОМАТОЛОГИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Карпук И.Ю.

УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Резюме. Исследования потенциальных биомаркеров в периодонтологической литературе фокусируются на анализе ротовой жидкости, где выявляется ряд потенциальных слюнных биомаркеров периодонтита. Биомаркеры должны быть простыми для анализа, выводы должны быть легко интерпретируемы и давать исчерпывающую информацию, например предугадывать начало заболевания, измерять его активность и отражать прогрессию заболевания (например от гингивита до периодонтита). Однако есть еще ряд научных, клинических и технологических задач для достижения успешного клинического применения слюнной диагностики при лечении периодонтита. Цель исследования — установить взаимосвязь неоптерина и $IFN\gamma$ в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным периодонтитом и у пациентов с непереносимостью стоматологических материалов для более полного понимания болезней периодонта. Показано, что средний уровень неоптерина у пациентов с хроническим генерализованным простым периодонтитом средней степени тяжести в стадии обострения до лечения был повышен и составил 11,6 [8,0; 15,4] нг/мл, что достоверно отличалось ($p < 0,05$) от уровня неоптерина после лечения — 5,5 [4,1; 7,1] нг/мл. Количество $IFN\gamma$ в ротовой жидкости у пациентов данной группы достоверно не изменилось до и после лечения и составило: до лечения — 6,7 [5,0; 8,7] пг/мл, а после лечения 5,5 [3,5; 7,1] пг/мл. У пациентов с хроническим генерализованным сложным периодонтитом тяжелой степени тяжести в стадии обострения до лечения уровень неоптерина был выше, чем у пациентов первой группы, и составил 8,2 [6,0; 9,9] нг/мл, что достоверно отличалось ($p < 0,05$) от результатов после лечения — 5,5 [4,1; 7,1] нг/мл. У пациентов данной группы проведение периодонтальной терапии оказывало влияние на уровень $IFN\gamma$ в ротовой жидкости, который составил: до лечения — 8,6 [7,3; 11,2] пг/мл, а после лечения — 5,4 [4,3; 6,7] пг/мл. Установлено, что индексы ОНІ-S и SBI, характеризующие состояние полости рта, взаимосвязаны с уровнями неоптерина и $IFN\gamma$. Показано, что увеличение концентрации неоптерина в ротовой жидкости и взаимосвязь его концентрации с индексом SBI у пациентов с хроническим генерализованным периодонтитом является независимым биомаркером исхода лечения. У пациентов с хроническим генерализованным периодонтитом установлена сильная высокозначимая корреляция $IFN\gamma$ и неоптерина в ротовой жидкости до лечения ($R = 0,82$; $p = 0,0001$) и после ($R = 0,78$; $p = 0,0001$) лечения в обеих группах.

Уровень неоптерина и $IFN\gamma$ у пациентов с жалобами на непереносимость зубопротезных материалов до снятия протезов и после снятия ортопедических конструкций достоверно не изменялся.

Ключевые слова: неоптерин, интерферон- γ , хронический периодонтит, диагностика, биомаркер

Адрес для переписки:

Карпук Иван Юрьевич
УО «Витебский государственный медицинский университет»
210602, Республика Беларусь, г. Витебск, пр. Фрунзе, 27.
Тел.: 8 (0212) 57-53-80.
E-mail: ikarpuk@mail.ru

Address for correspondence:

Karpuk Ivan Yu.
Vitebsk State Medical University
210602, Republic of Belarus, Vitebsk, Frunze str., 27.
Phone: 7 (0212) 57-53-80.
E-mail: ikarpuk@mail.ru

Образец цитирования:

И.Ю. Карпук «Взаимосвязь уровней неоптерина и $IFN\gamma$ у пациентов с обострением хронического периодонтита и непереносимостью стоматологических материалов» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 55-64. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-55-64

© Карпук И.Ю., 2017

For citation:

I.Yu. Karpuk "Correlation of Neopterin and $IFN\gamma$ levels in the patients with exacerbation of chronic periodontitis and intolerance of dental materials", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 55-64. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-55-64

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-55-64>

CORRELATION OF NEOPTERINE AND IFN γ LEVELS IN THE PATIENTS WITH EXACERBATION OF CHRONIC PERIODONTITIS AND INTOLERANCE OF DENTAL MATERIALS

Karpuk I.Yu.

Vitebsk State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Abstract. Studies of potential biomarkers in periodontology are focused on analysis of oral liquid which revealed a number of potential salivary periodontitis biomarkers. The biomarkers should be simple to perform, with easily interpretable results providing relevant information from initial stages of disease, to measure its activity, thus reflecting the disease evolution (e.g., from gingivitis to periodontitis). However there are some more scientific, clinical and technological tasks to develop successful clinical salivary diagnostics for periodontitis treatment. The purpose of our study was to assess interrelations of IFN γ and neopterin in oral fluid of the patients with chronic generalized periodontitis (CGP), aiming for more complete understanding of periodontal disorders and at patients with an intolerance of stomatologic materials. It is shown that the average levels of neopterin in exacerbated moderate-stage CGP patients was raised before treatment to 11.6 [8.0; 15.4] ng/ml, as compared with post-treatment level of 5.5 [4.1; 7.1] ng/ml ($p < 0.05$). Average amount of IFN γ in oral fluid from these patients group was 6.7 [5.0; 8.7] pg/ml before treatment, as compared to 5.5 [3.5; 7.1] pg/ml after treatment (no significant difference). Neopterin level in patients with exacerbated severe CGP before treatment was even higher than in patients of moderate/severe group, with an average of 8.2 [6.0; 9.9] ng/ml thus sufficiently exceeding post-treatment levels, i.e., 5.5 [4.1; 7.1] ng/ml ($p < 0.05$). A course of periodontal therapy in this group was associated with sufficient changes of IFN γ levels in oral fluid: appropriate levels before and after treatment were, respectively, 8.6 [7.3; 11.2] pg/ml, and 5.4 [4.3; 6.7] pg/ml. We have revealed that the OHI-S and SBI indexes characterizing conditions of oral cavity are interconnected with local neopterin and IFN γ levels. It is shown that an increased neopterin concentration in oral fluid and its correlation with SBI index in CGP patients is an independent biomarker of therapeutic effect. The patients with a CGP exhibited a highly significant correlation between initial levels of IFN γ and neopterin in oral fluid ($R = 0.82$; $p = 0.0001$), and after treatment ($R = 0.78$; $p = 0.0001$) in both groups of the patients.

Level of a neopterin and IFN γ at patients with complaints to intolerance of dentoprosthetic materials before removal of artificial limbs and after removal of orthopedic designs authentically didn't change.

Keywords: neopterin, chronic periodontitis, interferon-gamma, diagnostics, biomarker

Введение

Микробиологическая картина быстро прогрессирующего периодонтита, в равной степени как и хронического, осложнена тем, что только 50-60% видовых представителей оральной микрофлоры могут быть выращены культуральным методом. Это значит, что антибиотикотерапия в периодонтологии в большинстве своем эмпирическая, основана на использовании препаратов широкого спектра действия [2]. Этот факт указывает на необходимость поиска биомаркеров хронического периодонтита (ХП). Биомаркеры могут быть связаны с активностью заболевания, а также указывать на его дальнейшее течение и/или прогноз [2]. С этой целью предложено определять самые разнообразные маркеры тканевой деструкции и воспаления [9, 17].

Многие исследования потенциальных биомаркеров фокусируются на анализе ротовой жидкости (РЖ) [11]. Хотя ряд многообещающих биомаркеров был выявлен, анализ РЖ отражает активность заболевания в целом полости рта. Этот факт усложняет интерпретацию, однако, ряд маркеров, обнаруженных в РЖ, оказались потенциальными слюнными биомаркерами периодонтита [8].

Концепция биомаркеров появилась после признания необходимости в мониторинге статуса здоровья, восприимчивости к заболеванию, его прогрессирования, разрешения и исхода лечения. Биомаркеры были определены как «клеточные, биохимические, молекулярные или генетические изменения, по которым может быть распознан и наблюдаем нормальный, ненормальный

или обычный биологический процесс» [16]. Биомаркеры должны показывать физиологическое здоровье, патологические процессы и/или ответ на лечение.

Биомаркеры должны быть простыми для анализа, выводы должны быть легко интерпретируемы и давать исчерпывающую информацию, например предугадывать начало заболевания, измерять его активность и отражать прогрессию заболевания (например от гингивита до периодонтита). Однако есть еще ряд научных, клинических и технологических задач для достижения успешного клинического применения слюнной диагностики при лечении периодонтита [5].

Эпидемиологические исследования установили, что в гомогенной популяции с одинаковым распространением налета и уровнем гигиены полости рта болезни периодонта распределены неравномерно. Более того, клинически обыденным является то, что у некоторых пациентов не развивается периодонтит, несмотря на плохую гигиену полости рта, и в то же время те, кто имеет высокий уровень гигиены полости рта (и хорошее общее состояние организма), страдают от тяжелых форм периодонтита [15]. Люди, восприимчивые к периодонтиту, формируют чрезмерный нерегулируемый иммунный ответ к бактериям зубного налета, что ведет к разрушению тканей. Индивидуальная восприимчивость определяется сложным взаимодействием между вторичными факторами, такими как генетические и эпигенетические элементы, возраст, пол, курение, и общим здоровьем, что все в целом влияет на иммунный ответ [15].

Неоптерин [2-амино 4-гидрокси 6 (D-эритро 1,2,3-тригидроксипропил) птеридин] достаточно широко распространен в природе. История его изучения началась в 1963 г., когда неоптерин был впервые выделен из рабочей пчелы, ее личинки и маточного молочка. Производные неоптерина обнаружены у представителей различных типов и классов как животного, так и растительного мира. Это соединение выделено из бактерий, в том числе фотосинтезирующих, насекомых, млекопитающих, а также из растений. Основной интерес к неоптерину связан с его ролью маркера активации клеточного иммунитета человека.

Тем не менее биологическая роль неоптерина продолжает оставаться неясной. Неоптерин синтезируется из гуанозинтрифосфата. Фермент GTP СН I катализирует образование 7,8 – дигидронеоптеринтрифосфата из ГТФ. Отщепление

фосфорных остатков клеточными фосфатазами приводит к образованию 7,8 дигидронеоптерина, при неферментативном окислении которого и образуется неоптерин [12]. При патологических состояниях, связанных с активацией иммунной системы, концентрация неоптерина и 7,8 дигидронеоптерина в организме может значительно увеличиваться. Одними авторами приводятся значения в крови 100-250 нМ/л, другими – у пациентов с постоперативными инфекционными осложнениями отмечается уровень неоптерина в плазме 1,6 мкМ/л [3]. Первоначально полагали, что ответственными за увеличение концентрации неоптерина в организме являются Т-клетки. Однако позже было доказано, что главным его источником следует считать моноциты/макрофаги.

Ответственным за стимуляцию продукции неоптерина данными иммунокомпетентными клетками является IFN γ [4]. Однако, как показано на Т-клетках, непосредственно на активность ферментов, связанных с синтезом неоптерина, он не влияет. Наряду с этим неоптерин и 7,8-дигидронеоптерин способны стимулировать собственный синтез. Так, было отмечено, что 7,8-дигидронеоптерин увеличивает продукцию IFN γ Т-клетками [13]. Увеличение внутриклеточной концентрации Ca^{2+} играет важную роль в активации макрофагов, в частности приводит к активации NADPH оксидазы. Неоптерин способствует увеличению внутриклеточной концентрации Ca^{2+} в моноцитах, изменяя проницаемость их кальциевых каналов, что позволяет данным птеринам участвовать в Са-индуцированной активации этих клеток [6, 10].

Достоверное определение уровня цитокинов в биологических жидкостях сопряжено с рядом серьезных трудностей. В частности, это связано с локальной продукцией цитокинов, коротким периодом их полужизни и циркуляцией в связанном состоянии – в комплексе с другими белками. Это приводит к значительным флуктуациям в данных клинических анализов и очень условно отражает продукцию цитокинов клетками. Так как неоптерин является стабильным соединением (в окисленном состоянии), легко и точно детектируется, а основным стимулом его продукции признан IFN γ , то он способен быть дополнительным инструментом в оценке достоверного уровня IFN γ в организме [14]. Поскольку такая активация имеет место при очень широком круге патологических состояний, неоптерин как неспецифический маркер находит все большее

применение в клинической лабораторной диагностике.

Одним из принципиальных диагностических подходов на ранней стадии ХП может быть выявление иммунных нарушений, свойственных ХП, которые охватывают клеточное и гуморальное звенья иммунной системы. Мы полагаем, что информативным показателем, отражающим активацию клеточного иммунитета при ХП, является неоптерин, лучше коррелирующий с рядом показателей активности и тяжести ХП, чем ряд цитокинов [14].

В связи с вышесказанным представляет особый интерес изучение взаимосвязи уровня неоптерина и IFN γ у больных ХП и определение его роли как маркера прогрессирования воспалительно-деструктивного процесса.

Материалы и методы

Характеристика обследованных больных

До начала исследования все пациенты были осмотрены с целью определения общего состояния (определена температура тела, состояние регионарных лимфоузлов, общее самочувствие) и состояния тканей периодонта: ОНI-S, SBI, а также проводилась оценка ортопантограмм. Степень деструкции тканей периодонта определяли на основании анализа ортопантограмм и данных индекса PI (Russel). Оценку вышеперечисленных показателей проводили в первое посещение и на четырнадцатый день.

Было обследовано 50 больных с хроническим генерализованным сложным и простым периодонтитом, средней и тяжелой степеней тяжести в стадии обострения, которые были разделены на 2 группы в соответствии с международной классификацией стоматологических болезней МКБ-С-3 на основе МКБ-10 (ВОЗ, 1995) и классификацией, утвержденной Американской академией периодонтологов (1999) [16]:

1 группа — 25 больных с хроническим генерализованным простым периодонтитом средней степени тяжести в стадии обострения. Средний возраст в данной группе составил 42 [38; 47] года. Из них 8 мужчин и 17 женщин.

2 группа — 25 больных с хроническим генерализованным сложным периодонтитом тяжелой степени тяжести в стадии обострения. Средний возраст в данной группе составил 49 [43; 53] года. Из них 8 мужчин и 17 женщин.

3 группа — 20 больных с жалобами на непереносимость стоматологических материалов. Сред-

ний возраст в данной группе составил 45 [39; 51] лет. Из них 2 мужчин и 18 женщин.

Следует отметить, что большинство больных второй группы имели признаки агрессивного течения заболевания, что мы связываем с вторичной иммунной недостаточностью.

Критериями включения пациентов в опытную группу являлись: возраст 18-65 лет, минимум 18 сохранившихся зубов, за исключением 3-их моляров, частые обострения заболевания: более 4 раз в течение последних 12 месяцев, отсутствие системных заболеваний, отсутствие периодонтального лечения, системной антибактериальной и противовоспалительной терапии в течение 6 месяцев перед данным исследованием, добровольное информированное согласие.

Критериями исключения являлись: беременность, уровень мочевого кислоты в крови более 0,38 ммоль/л.

При подборе пациентов исключали больных с тяжелой соматической патологией. Обострений сопутствующих заболеваний у пациентов на момент обследования не отмечалось. Особое внимание уделялось анамнестическим данным (давность заболевания, длительность ремиссии, лечение и его результаты).

Обследование больных проводилось по единой схеме, на каждого пациента заполнялась амбулаторная карта стоматологического здоровья и разработанная карта обследования, где отмечались результаты проведенных клинических, лабораторных и дополнительных методов исследования.

При клиническом обследовании велась оценка стоматологического и общего здоровья пациента, базирующаяся на рекомендациях ВОЗ.

Основные этапы такой оценки включали:

1. Опрос с выяснением истории стоматологического и периодонтологического анамнезов (уровень мотивации и осведомленности по гигиене полости рта, регулярность повторных визитов, наличие конкретных жалоб, время их появления, продолжительность заболевания, частота обострений, характер и результаты предшествующего лечения).

2. Оценка уровня общемедицинского и семейного анамнеза (наличие сопутствующих и перенесенных заболеваний, аллергоанамнез, наследственный фактор, характер питания, профессиональные вредности).

3. Клинический осмотр включал экстраоральную (внешний осмотр), периоральную (область губ, носогубные складки) и интраоральную оценку ротовой полости.

Рентгенологическое обследование включало в себя ортопантомографию и прицельные денальные снимки. При анализе рентгенограмм фиксировался ряд определенных рентгенологических параметров: степень активности костных деструктивных изменений по характеру контура зон резорбции, их четкости, наличие очагов остеопороза; наличие поддесневых зубных отложений; состояние периодонтальной щели; состояние фуркаций; наличие нависающих краев пломб, положение краев искусственных коронок по отношению к контуру естественной коронки и относительно эмалево-цементной границы; структура ткани челюстей, анатомические особенности зубов и зубных рядов [1].

Всем пациентам проводилось традиционное базовое лечение с учетом индивидуальных особенностей, которое включало следующие мероприятия:

1. Мотивацию пациента и обучение гигиене полости рта с последующим неоднократным контролем и коррекцией до тех пор, пока не сформируются устойчивые гигиенические навыки на высоком уровне. Обучение методам чистки зубов. Пациенты проводили чистку зубов по модифицированному методу Басса для пациентов без рецессии десны, а также по методу Стилмана для пациентов с рецессией с использованием зубных паст, не содержащих в своем составе активных антисептиков.

2. Профессиональную гигиену полости рта (поэтапное инструментальное и аппаратное удаление над- и поддесневых зубных отложений, полировка зубов и пломб).

3. Устранение местных факторов, способствующих скоплению и активации действия микробного фактора (пломбирование придесневых кариозных полостей, устранение дефектов пломб, восстановление межзубных контактов).

4. Шинирование подвижных зубов.

5. Функциональное избирательное пришлифовывание.

6. Местную противовоспалительную терапию.

7. Закрытый кюретаж периодонтальных карманов.

8. Коррекцию мягких тканей преддверия полости рта.

9. Физиотерапевтические методы лечения (вакуум-массаж, гидромассаж десен).

Методика забора и подготовки к исследованию ротовой жидкости

Ротовую жидкость (РЖ) получали путем сплевывания в стерильные пробирки без стимуляции утром, натощак, без предварительной чистки зубов и полоскания.

Образцы РЖ (1-1,5 мл) центрифугировали при 7000 об/мин в течение 20 минут. Далее пробы фильтровали через нитроцеллюлозные фильтры с диаметром пор 0,22 мкм.

Лабораторные методы обследования

Определение уровня неоптерина осуществляли с использованием набора реагентов методом иммуноферментного анализа (IBL International immunoassays, Hamburg, Germany).

С целью количественного определения IFN γ проводили твердофазный иммуноферментный анализ с использованием тест-системы ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск, Россия).

Статистическая обработка результатов исследования проводилась при помощи STATISTICA 10.0. Количественные параметры представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного интервала ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$), где $Q_{0,25}$ — верхняя граница нижнего квартиля, $Q_{0,75}$ — нижняя граница верхнего квартиля. Для анализа различий в двух независимых группах по количественному признаку применялся непараметрический критерий U Манна-Уитни. Для анализа различий в двух зависимых группах по количественному признаку применялся критерий Вилкоксона. Для определения меры связи двух количественных параметров использовали анализ ранговой корреляции Spearman (непараметрический) с уровнем статистической значимости $p < 0,05$.

Цель исследования — установить взаимосвязь неоптерина и IFN γ в ротовой жидкости больных хроническим генерализованным периодонтитом для более полного понимания болезней периодонта.

Результаты

Подавляющее большинство пациентов при обращении имели плохой или неудовлетворительный уровень гигиены. На 4-5 день практически все пациенты отмечали исчезновение симптомов обострения процесса. Через 14 дней после начала лечения у всех больных заметно улучшалось гигиеническое состояние полости рта. При этом среднее значение индекса гигиены ОНП-S в группе больных с хроническим генерализованным простым периодонтитом средней

степени тяжести в стадии обострения снизилось с 2,25 [1,83; 2,42] до 0,5 [0,5; 0,66], в группе больных с хронический генерализованным сложным периодонтитом тяжелой степеней тяжести в стадии обострения снизилось с 2,33 [2,0; 2,42] до 0,67 [0,33; 0,83].

Значительное снижение индекса гигиены ОНІ-S у больных обеих групп можно связать с мотивацией и постоянным контролем и коррекцией за соблюдением оптимальной гигиены полости рта, проведением комплекса профессиональной гигиены полости рта.

Параметры объективных тестов, характеризующих воспаление в тканях периодонта также показали позитивную динамику.

Значения индекса кровоточивости SBI при зондировании претерпели положительные изменения, что выражалось в редукции показателя: с 67,8% [58; 77,4] до 13 [9,7; 19,3] в первой группе, и с 79,6% [64,9; 87,8] до 19,1 [17; 21] во второй группе.

На четырнадцатый день параметры индекса ПИ (Russel) у пациентов первой группы снизился с 2,6 [2,4; 2,9] до 1,6 [1,4; 1,9] — более чем в 2 раза. У пациентов второй группы индекс ПИ (Russel) снизился менее выраженно — с 4,6 [4,2; 5,0] до 2,6 [2,0; 3,0], что по нашему мнению обусловлено

тем, что у них имеет место иммунодефицитная болезнь, требующая дополнительной иммунорекоррекции.

Глубина периодонтального кармана изменилась следующим образом: у пациентов первой группы — с 3,7 [3,5; 4,0] до 3,5 [3,0; 3,5], у пациентов второй группы — с 5,5 [5,0; 6,0] до 4,0 [3,5; 4,5].

По завершении курса лечения практически у всех больных обеих групп десна приобретала розовый цвет, правильную конфигурацию и плотность, значительно уменьшалось и прекратилось выделение экссудата из периодонтальных карманов, уменьшилась подвижность зубов.

Определение уровня неоптерина и IFN γ в РЖ

Уровень неоптерина и IFN γ в РЖ определяли до начала лечения и на 14 день после лечения.

При анализе полученных результатов отмечено, что средний уровень неоптерина у пациентов с ХП средней степеней тяжести до лечения был повышен и составил 8,2 [6,0; 9,9] нг/мл, что достоверно отличалось ($p < 0,05$) от таковых после лечения 5,4 [3,6; 7,2] нг/мл. Количество IFN γ в РЖ у пациентов данной группы достоверно не изменилось до и после лечения и составило до лечения — 6,7 [5,0; 8,7] пг/мл, а после лечения — 5,5 [3,5; 7,1] пг/мл (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ СРЕДНЕГО УРОВНЯ И РАЗБРОСА ЗНАЧЕНИЙ УРОВНЯ НЕОПТЕРИНА И IFN γ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПРОСТЫМ ПЕРИОДОНТИТОМ СРЕДНЕЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 1. AVERAGE LEVELS AND SCATTER LIMITS FOR NEOPTERIN AND IFN γ LEVELS IN ORAL FLUID IN PATIENTS WITH CHRONIC GENERALIZED SIMPLE PERIODONTITIS BEFORE AND AFTER TREATMENT

Параметр Parameters	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	p-level
Неоптерин Neopterin (ng/ml)	8,2 [6,0; 9,9]	5,4 [3,6; 7,2]	0,0001
IFN γ (pg/ml)	6,7 [5,0; 8,7]	5,5 [3,5; 7,1]	0,3

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ СРЕДНЕГО УРОВНЯ И РАЗБРОСА ЗНАЧЕНИЙ УРОВНЯ НЕОПТЕРИНА И IFN γ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ СЛОЖНЫМ ПЕРИОДОНТИТОМ ТЯЖЕЛОЙ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ДО И ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ

TABLE 2. AVERAGE LEVELS AND SCATTER LIMITS FOR NEOPTERIN AND IFN γ IN ORAL FLUID IN PATIENTS WITH CHRONIC GENERALIZED COMPLEX SEVERE PERIODONTITIS BEFORE AND AFTER TREATMENT

Параметр Parameters	До лечения Before treatment	После лечения After treatment	p-level
Неоптерин Neopterin (ng/ml)	11,6 [8,0; 15,4]	5,5 [4,1; 7,1]	0,01
IFN γ (pg/ml)	8,6 [7,3; 11,2]	5,4 [4,3; 6,7]	0,04

ТАБЛИЦА 3. КОРРЕЛЯЦИЯ (SPEARMAN) УРОВНЯ ГИГИЕНЫ (ОHI-S) С УРОВНЕМ НЕОПТЕРИНА И IFN γ У ПАЦИЕНТОВ ОБЕИХ ГРУПП

TABLE 3. SPEARMAN CORRELATION BETWEEN DENTAL HYGIENE INDEX (OHI-S), NEOPTERIN AND IFN γ LEVELS IN PATIENTS FROM BOTH PERIODONTITIS GROUPS

Параметр Parameters	ОHI-S до лечения (1 гр.) OHI-S before treatment (1 group)	p-level	ОHI-S после лечения (1 гр.) OHI-S after treatment (1 group)	p-level	ОHI-S до лечения (2 гр.) OHI-S before treatment (2 group)	p-level	ОHI-S после лечения (2 гр.) OHI-S after treatment (2 group)	p-level
Уровень неоп- терина до лечения Neopterin level before treatment	0,64	0,001	0,27	0,4	0,83	0,001	0,09	0,17
Уровень неоп- терина после лечения Neopterin level after treatment	0,26	0,2	0,21	0,06	0,07	0,3	-0,12	0,07
IFN γ до лечения IFN γ level before treatment	0,48	0,002	0,25	0,1	0,69	0,0001	0,058	0,13
IFN γ после лече- ния IFN γ level after treatment	0,19	0,1	0,13	0,3	0,16	0,1	0,057	0,15

ТАБЛИЦА 4. КОРРЕЛЯЦИЯ (SPEARMAN) МЕЖДУ ИНДЕКСОМ SBI С УРОВНЕМ НЕОПТЕРИНА У ПАЦИЕНТОВ ОБЕИХ ГРУПП

TABLE 4. SPEARMAN CORRELATION BETWEEN SBI INDEX AND NEOPTERIN LEVEL IN PATIENTS FROM BOTH PERIODONTITIS GROUPS

Неоптерин Neopterin	SBI до лечения (1 гр.) SBI before treatment (group1)	p-level	SBI после лечения (1 гр.) SBI after treatment (group1)	p-level	SBI до лечения (2 гр.) SBI before treatment (2 group)	p-level	SBI после лечения (2 гр.) SBI after treatment (2 group)	p-level
До лечения Before treatment	0,62	0,001	0,81	0,00002	0,74	0,001	0,51	0,0001
После лечения After treatment	-0,16	0,2	0,07	0,06	0,067	0,3	0,29	0,09

Результаты показали, что уровень неоптерина в РЖ у пациентов с хроническим генерализованным сложным периодонтитом тяжелой степени тяжести до лечения был еще более высок, чем у пациентов первой группы, и составил 11,6 [8,0; 15,4] нг/мл, что достоверно отличалось ($p < 0,05$) от таковых после лечения 5,5 [4,1; 7,1] нг/мл. У пациентов данной группы проведение периодонтальной терапии снизило уровень IFN γ в РЖ, который составил:

до лечения – 8,6 [7,3; 11,2] пг/мл, а после лечения – 5,4 [4,3; 6,7] пг/мл (табл. 2).

Уровень неоптерина у пациентов 2 группы был выше в 1,4 раза, чем у пациентов 1 группы, а после лечения практически не отличался у пациентов обеих групп.

Определение уровня неоптерина и IFN γ в РЖ

Уровень неоптерина у пациентов с жалобами на непереносимость зубопротезных материалов до снятия протезов (5,5 [4,1; 7,1] пг/мл) и через

месяц после снятия ортопедических конструкций (5,1 [3,9; 6,2] пг/мл). Уровень $IFN\gamma$ в РЖ данных пациентов, который составил до лечения 8,6 [7,3; 11,2] пг/мл, а после лечения 5,4 [4,3; 6,7] пг/мл. Как видно из приведенных данных, уровни неоптерина и $IFN\gamma$ в РЖ достоверно не изменялись до и после снятия ортопедических конструкций.

Анализ корреляции результатов определения уровня неоптерина и $IFN\gamma$ в ротовой жидкости обследованных пациентов с результатами индексной оценки уровня гигиены и воспалительных явлений в периодонте

В группе больных с хроническим генерализованным простым периодонтитом средней степени тяжести в стадии обострения анализ взаимосвязи результатов показал наличие умеренной корреляции между результатами определения уровня неоптерина в ротовой жидкости и значением индекса гигиены ОНI-S в первое посещение ($R = 0,64$; $p = 0,001$), а после лечения взаимосвязи между вышеуказанными параметрами выявлено не было ($R = 0,27$; $p = 0,2$). Выявлена значимая умеренная корреляция между количеством $IFN\gamma$ в РЖ с индексом ОНI-S до лечения ($R = 0,48$; $p = 0,002$) (табл. 3).

Следует отметить, что в группе больных с хроническим генерализованным сложным периодонтитом тяжелой степени тяжести в стадии обострения анализ взаимосвязи результатов также показал наличие умеренной корреляции между результатами определения уровня неоптерина в ротовой жидкости и значением индекса гигиены ОНI-S в первое посещение ($R = 0,83$; $p = 0,001$), а после лечения взаимосвязи между вышеуказанными параметрами выявлено не было. Нами установлено наличие умеренной корреляции между концентрацией $IFN\gamma$ и ОНI-S до лечения ($R = 0,69$; $p = 0,0001$) (табл. 3).

Проводя анализ взаимосвязей в группе больных с хроническим генерализованным простым периодонтитом средней степени тяжести в стадии обострения, было установлено наличие умеренной корреляции между результатами определения уровня неоптерина в ротовой жидкости и значением индекса SBI в первое посещение ($R = 0,62$; $p = 0,001$). Установлена сильная взаимосвязь между результатами определения уровня неоптерина в ротовой жидкости до лечения и значением индекса SBI после лечения ($R = 0,81$; $p = 0,00002$). Также установлено наличие взаимосвязи результатов определения $IFN\gamma$ в РЖ с индексом SBI до ($R = 0,74$; $p = 0,001$) до лечения (табл. 4).

В группе больных с хроническим генерализованным сложным периодонтитом тяжелой степени тяжести в стадии обострения анализ взаимосвязи результатов также показал наличие сильной корреляции между результатами определения уровня неоптерина в ротовой жидкости и значением индекса SBI в первое посещение ($R = 0,74$; $p = 0,001$), а также умеренной корреляции между уровнем неоптерина до лечения и SBI после лечения ($R = 0,51$; $p = 0,0001$). Проведенный анализ выявил взаимосвязи результатов определения $IFN\gamma$ в РЖ с индексом SBI до ($R = 0,65$; $p = 0,0001$) и после ($R = 0,43$; $p = 0,001$) лечения в обеих группах (табл. 4).

Обсуждение

Указанные выше изменения уровней неоптерина в РЖ и индексов, объективно характеризующие состояние периодонта и уровня гигиены у пациентов с хроническим генерализованным периодонтитом, диктуют необходимость дальнейшего изучения этого вопроса для ранней диагностики и улучшения качества лечения данной категории больных. Увеличение концентрации неоптерина в РЖ и взаимосвязь его концентрации с индексом SBI у пациентов с хроническим генерализованным периодонтитом является независимым предиктором исхода лечения.

В результате проведенного исследования становится очевидной связь повышенного содержания неоптерина в РЖ со степенью тяжести хронического генерализованного периодонтита. По нашему мнению, связь повышения концентрации неоптерина с тяжестью заболеваний периодонта и ухудшением гигиены делает тест потенциально перспективным для предварительного заключения о необходимости включения в схему лечения иммуномодуляторов.

В ходе исследования установлено, что индексы ОНI-S и SBI, характеризующие состояние полости рта, взаимосвязаны с уровнями неоптерина и $IFN\gamma$. Исходя из этого мы считаем, что увеличение концентрации неоптерина в ротовой жидкости и взаимосвязь его концентрации с индексом SBI у пациентов с хроническим генерализованным периодонтитом является независимым биомаркером исхода лечения. Данный факт подтверждается наличием сильной высоко значимой корреляции $IFN\gamma$ и неоптерина в ротовой жидкости до лечения ($R = 0,82$; $p = 0,0001$) и после ($R = 0,78$; $p = 0,0001$) лечения в обеих группах соответственно.

IFN γ является уникальным цитокином, обеспечивающим взаимодействие множества клеточных систем посредством контроля транскрипции большого количества генов [7]. Однако для всестороннего, комплексного понимания функционирования специфического клеточного иммунного ответа у конкретного пациента целесообразно исследование продукции множества биоактивных молекул, обеспечивающих регуляторные и эффекторные функции друг друга. Определение IFN γ и неоптерина в комплексе с другими лабораторными методами исследования позволит получить результаты, достоверно отражающие состояние иммунитета.

Заключение

Таким образом, у пациентов с хроническим генерализованным простым периодонтитом

средней степени тяжести в стадии обострения средний уровень неоптерина в ротовой жидкости до лечения был повышен и достоверно отличался ($p < 0,05$) от его уровня после лечения. Количество IFN γ в ротовой жидкости у пациентов данной группы достоверно не изменилось до и после лечения. У пациентов с хроническим генерализованным сложным периодонтитом тяжелой степени тяжести в стадии обострения уровень неоптерина до лечения был еще более высок, чем у пациентов первой группы, а после лечения снижался, как и уровень IFN γ в ротовой жидкости.

У пациентов с непереносимостью стоматологических материалов уровни неоптерина и IFN γ в РЖ достоверно не изменялись до и после снятия ортопедических конструкций.

Список литературы / References

1. Артюшкевич А.С., Латышева С.В., Наумович С.А. Заболевания периодонта. М.: Мед. лит., 2006. 328 с. [Artyushkevich A.S., Latysheva S.V., Naumovich S.A. Periodontal diseases]. Moscow: Medical Literature, 2006. 328 p.
2. Дедова Л.Н., Лапицкая А.В. Быстро прогрессирующий периодонтит: методы лечения. Ч. 2 // Стоматолог, 2014. № 1. С. 11-16. [Dedova L.N., Lapitskaya A.V. Aggressive periodontitis: current methods (part 2). *Stomatolog = Stomatologist*, 2014, no. 1, pp. 11-16. (In Russ.)]
3. Лебедев М.Ю., Пученкина Е.В. Динамика изменений содержания неоптерина и интерферона-гамма в сыворотке крови у пациентов с ожоговой травмой // Фундаментальные исследования, 2012. № 12-2. С. 294-297. [Lebedev M.Y., Puchenkina E.V. The dynamics of serum levels of neopterin and interferon-gamma in burn patients. *Fundamental' nye issledovaniya = Fundamental Research*, 2012, no. 12-2, pp. 294-297. (In Russ.)]
4. Пустовалова Р.А., Петрова М.Б. Неоптерин как показатель активности воспалительного этапа раневого процесса в коже // Биомед. Химия, 2011. Т. 57, вып. 4. С. 461-468. [Pustovalova R.A., Petrova M.B. Neopterin as an indicator of activity of an inflammatory stage of a wound process in a skin. *Biomed. Himiya = Biomed. Chemistry*, 2011, Vol. 57, no. 4, pp. 461-468. (In Russ.)]
5. Baum B.J. Scientific frontiers: emerging technologies for salivary diagnostics. *Adv. Dent. Res.*, 2011, Vol. 23, no. 4, pp. 360-368.
6. Beksac K. Evaluation of pro-inflammatory cytokine and neopterin levels in women with papillary thyroid carcinoma. *Int. J. Biol. Markers*, 2016, pp. 10-16.
7. Billiau A., Matthys P. Interferon-gamma: a historical perspective. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 2009, Vol. 20, no. 2, pp. 97-113.
8. Buduneli N., Kinane D.F. Host-derived diagnostic markers related to soft tissue destruction and bone degradation in periodontitis. *J. Clin. Periodontol.*, 2011, Vol. 38, Suppl. 11, pp. 85-105.
9. Horz H.-P., Conrads G. Diagnosis and anti-infective therapy of periodontitis. *Expert. Rev. Anti-Infect. Ther.*, 2007, Vol. 5, no. 4, pp. 703-715.
10. Loe H., Anerud A., Boysen H., Morrison E. Natural history of periodontal disease in man. Rapid, moderate and no loss of attachment in Sri Lankan laborers 14 to 46 years of age. *J. Clin. Periodontol.*, 1986, Vol. 13, no. 5, pp. 431-445.
11. Loos B.G., Tjoa S. Host-derived diagnostic markers for periodontitis: do they exist in gingival crevice fluid? *Periodontology*, 2005, Vol. 39, pp. 53-72.
12. Magnus M.C. Maternal plasma total neopterin and kynurenine/tryptophan levels during pregnancy in relation to asthma development in the offspring. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2016, pp. 68-76.
13. Muller T.F. Low serial serum neopterin does not predict low risk for chronic renal graft rejection. *Pediatr. Nephrol.*, 2001, Vol. 16, pp. 11-14.

14. Ozmeriç N. Baydar T., Bodur A., Ayse B.E., Ahu U., Kaya E., Sahin G. Level of neopterin, a marker of immune cell activation in gingival crevicular fluid, saliva, and urine in patients with aggressive periodontitis. *Periodontol.*, 2002, Jul, Vol. 73, no. 7, pp. 720-725.
15. Preshaw P.M., Taylor J.J. How has research into cytokine interactions and their role in driving immune responses impacted our understanding of periodontitis? *J. Clin. Periodontol.*, 2011, Vol. 38, Suppl. 11, pp. 60-84.
16. Wong, D.T. Salivary diagnostics powered by nanotechnologies, proteomics and genomics. *J. Am. Dent. Assoc.*, 2006, Vol. 137, no. 3, pp. 313-321.
17. Zia A., Khan S., Bey A., Gupta N.D., Mukhtar-Un-Nisar S. Oral biomarkers in the diagnosis and progression of periodontal diseases. *Biol. Med.*, 2011, Vol. 3, no. 2, pp. 45-52.

Автор:

Карпук И.Ю. — к.м.н., докторант кафедры
клинической иммунологии и аллергологии с курсом ФПК
и ПК УО «Витебский государственный медицинский
университет», г. Витебск, Республика Беларусь

Author:

Karpuk I.Yu., PhD (Medicine), Associate Professor,
Department of Clinical Immunology and Allergology, Vitebsk
State Medical University, Vitebsk, Republic of Belarus

Поступила 21.09.2016
Принята к печати 22.09.2016

Received 21.09.2016
Accepted 22.09.2016

РЕГУЛЯЦИЯ ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ЧАСТИЧНО КОНТРОЛИРУЕМОЙ И КОНТРОЛИРУЕМОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

**Барабаш Е.Ю., Калинина Е.П., Гвозденко Т.А., Денисенко Ю.К.,
Новгородцева Т.П., Антонюк М.В., Ходосова К.К.**

*Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения,
г. Владивосток, Россия*

Резюме. В исследование включены 17 условно здоровых лиц (группа 1) и 88 больных в возрасте от 22 до 48 лет с диагнозом «бронхиальная астма» (БА). В группу 2 вошли 9 пациентов с БА контролируемого течения, в группу 3 — с диагнозом «частично контролируемая БА» ($n = 79$). Во второй группе 8 человек имели легкое течение БА, в третьей — 57. Определяли уровни интерлейкинов IL-4, IL-10, IL-17A, интерферона- γ (IFN γ) и фактора некроза опухоли- α (TNF α) методом проточной цитометрии. Параметры клеточного иммунитета определялись методом проточной цитофлуориметрии. Показатели фагоцитоза изучали по методу Д.Н. Маянского, метаболическую активность нейтрофилов — по методу В.Н. Park в модификации Е.В. Шмелёва. При анализе показателей клеточного звена иммунной системы статистически значимых различий между субпопуляциями CD-лимфоцитов у здоровых и больных не выявлено. У больных с контролируемым и частично контролируемым течением БА отмечены изменения в концентрации цитокинов, которые характеризовались повышением уровня IL-4, IL-17A, IL-10, TNF α , изменениями фагоцитарной и кислородзависимой бактерицидной активности нейтрофилов. Установлено, что концентрации IL-4, IL-17A возрастают более значимо в группе пациентов с отсутствием полного контроля над течением заболевания (группа 3) по сравнению с группой, имеющей контролируемое течение БА (группа 2). Индукция TNF α остается на статистически значимо высоком уровне в обеих группах наблюдения с БА, превышающем в 2,3 раза группу здоровых добровольцев. Степень продукции IL-10 у пациентов группы с контролируемой БА (группа 2) была статистически значимо выше, чем в группе с частичным контролем астмы (группа 3) $p < 0,001$, что позволяет рассматривать его в качестве контроля активной воспалительной реакции. В группе у больных с БА (2 и 3 группы) уровень базального IFN γ был статистически значимо ниже, чем у здоровых добровольцев ($p < 0,001$). При частичном контроле БА (группа 3) этот показатель был занижен в 3 раза по сравнению с группой здоровых лиц. При изучении функционального состояния клеток моноцитарно-макрофагальной системы установлены статистически значимые различия у больных БА и здоровых лиц. Уменьшение резервных возможностей нейтрофильных гранулоцитов, снижение их окислительно-метаболизма в одинаковой степени характерно как для лиц с частично контролируемой БА, так и с контролируемой БА (группы 2 и 3), то есть не зависело от степени контроля заболевания.

Ключевые слова: бронхиальная астма, степени контроля, иммунная система, цитокины, нейтрофилы, иммунорегуляция

Адрес для переписки:

Барабаш Екатерина Юрьевна
Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный
научный центр физиологии и патологии дыхания» —
Научно-исследовательский институт медицинской
климатологии и восстановительного лечения
690105, Россия, г. Владивосток, ул. Русская, 73г.
Тел./факс: 8 (423) 278-82-01.
E-mail: vash-allergolog@mail.ru

Address for correspondence:

Barabash Ekaterina Yu.
Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation
Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center
of Respiratory Physiology and Pathology
690105, Russian Federation, Vladivostok, Russkaya str., 73g.
Phone/Fax: 7 (423) 278-82-01.
E-mail: vash-allergolog@mail.ru

Образец цитирования:

Е.Ю. Барабаш, Е.П. Калинина, Т.А. Гвозденко,
Ю.К. Денисенко, Т.П. Новгородцева, М.В. Антонюк,
К.К. Ходосова «Регуляция иммунного ответа у пациентов
с частично контролируемой и контролируемой
бронхиальной астмой» // Медицинская иммунология, 2017.
Т. 19, № 1. С. 65–72. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-65-72

© Барабаш Е.Ю. и соавт., 2017

For citation:

E.Yu. Barabash, E.P. Kalinina, T.A. Gvozdenko, Yu.K. Denisenko,
T.P. Novgorodtseva, M.V. Antonyuk, K.K. Khodosova "Regulation
of immune response of patients with partially controlled vs controlled
bronchial asthma", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 65–72.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-65-72

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-65-72>

REGULATION OF IMMUNE RESPONSE OF PATIENTS WITH PARTIALLY CONTROLLED vs CONTROLLED BRONCHIAL ASTHMA

Barabash E.Yu., Kalinina E.P., Gvozdenko T.A., Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Khodosova K.K.

Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. A control group included seventeen conditionally healthy people (Group 1). Eighty-eight patients with proven bronchial asthma (BA) at the age of 22 to 48 were enrolled into the study. I.e., Group 2 included nine patients with well-controlled BA. Group 3 included persons with partially controlled BA (n=79). There were 8 people with easily treated BA in group 2, and 57 such cases in Group 3. The levels of interleukins (IL-4, IL-10, IL-17A), interferon- γ (IFN γ), and tumor- α necrosis factor (TNF α) were monitored by means of flow cytometry technique. The parameters of cellular immunity were registered by flow cytofluorimetry assays. Phagocytosis indicators were studied by means of D. Mayansky method, metabolic activity of neutrophils, by the B.Park method, as modified by E.Shmelev. Evaluation of cellular immunity did not reveal statistically significant differences for distinct CD subpopulations between healthy controls and BA patients. The patients with controlled and partially controlled BA exhibited some changes in cytokine concentrations, i.e., increased IL-4, IL-17A, IL-10 and TNF α levels; changes in phagocytosis and oxygen dependent bactericidal activities of neutrophils. We have revealed higher concentrations of IL-4, IL-17A in the less controlled BA (group 3), as compared with group 2. TNF α induction remained at significantly higher level in both groups of BA patients, exceeding mean control values by 2.3 times. The degree of IL-10 production in group 2 with controlled BA was significantly higher than in group with partial disease control (group 3, $p < 0.001$), thus suggesting application of IL-10 levels as an index of active inflammation control. Patients with BA (groups 2, 3) exhibited a decrease of basal IFN γ , as compared to healthy people ($p < 0.001$). In group 3 (partial control), this parameter was 3-fold lower than in healthy persons. Evaluation of monocyte/phagocyte functions showed statistically significant differences between BA patients and healthy persons. Functional reserve of granulocyte activity and oxidative metabolism were decreased to a similar degree in the patients with well-controlled and partially resistant BA, thus showing their independence on the quality of disease control.

Keywords: bronchial asthma, immune system, cytokines, neutrophils, immune regulation, reference values

Введение

Бронхиальная астма (БА) — одно из распространенных заболеваний в мире. Достигнуты определенные успехи в лечении пациентов с БА, однако у большинства пациентов контроль над симптомами заболевания остается низким [1, 2, 4, 5, 14]. За последние 10 лет Российское респираторное общество дважды проводило эпидемиологическое исследование, целью которого являлся анализ эффективности проводимых лечебных программ. Согласно полученным данным, доля больных с тяжелой формой БА превышает 20%, что означает низкую эффективность обсуждаемых медикаментозных методов лечения, неадекватный выбор лекарственных средств, низкий уровень сотрудничества между врачом и пациентом и др. [7, 12, 15, 16, 17, 20].

В основе патогенеза заболевания лежит хроническое аллергическое воспаление бронхов,

сопровожающееся их гиперреактивностью и периодически возникающими приступами затрудненного дыхания или удушья в результате бронхиальной обструкции, обусловленной бронхоконстрикцией, гиперсекрецией слизи, отеком стенки бронхов. В настоящее время важнейшая роль в регуляции иммунного ответа отводится растворимым медиаторам, осуществляющим все взаимодействия между клетками иммунной системы [21]. Изучение особенностей регуляции иммунного ответа у пациентов с БА позволяет оптимизировать терапию данного заболевания.

Цель исследования: определить особенности регуляции иммунного ответа у пациентов с частично контролируемой и контролируемой БА путем изучения сывороточной концентрации цитокинов, показателей клеточного и моноцитарно-макрофагального звеньев иммунитета.

Материалы и методы

В исследовании на условиях добровольного информированного согласия участвовали 88 человек в возрасте от 22 до 48 лет (средний возраст $36,3 \pm 1,0$ год), находившиеся на восстановительном лечении в клинике Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИИМКВЛ с 2012 по 2015 гг. Исследование проводилось в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации (2013). Протокол исследования одобрен этическим комитетом Владивостокского филиала ДНЦ ФПД – НИИМКВЛ.

Среди обследованных было 57 женщин (средний возраст $37,4 \pm 1,6$ года) и 31 мужчина (средний возраст $34,3 \pm 2,3$ лет). Диагноз пациентам был выставлен на основании жалоб, клинических, лабораторно-инструментальных данных в соответствии с МКБ-10, Глобальной стратегией лечения и профилактики бронхиальной астмы пересмотра 2014 года [21] и рекомендациями Российского респираторного общества. В группу сравнения вошли 17 условно здоровых лиц, сопоставимых по возрасту и полу с группами наблюдения, без признаков атопии в анамнезе. Среди обследованных добровольцев было 9 женщин (средний возраст $30,4 \pm 1,5$ лет) и 8 мужчин (средний возраст $40,7 \pm 2,3$ лет). Пациенты из группы контроля (группа 1) были некурящими, не имели аллергических заболеваний, хронических заболеваний, на момент обследования у них отсутствовали острые заболевания.

В группе наблюдения 9 человек (группа 2) имели контролируемое течение БА, среди них 8 человек – с легким течением и 1 со средней степенью тяжести заболевания. Группа 3 включала 79 человек с частичным контролем над течением БА, среди них 22 человека имели среднюю степень тяжести, 57 человек – легкую степень тяжести.

Критерием включения в исследование служила диагностированная бронхиальная астма. При оценке контроля над симптомами БА ориентировались на жалобы, клинические проявления, результаты ACQ-5 теста (Asthma Control Questionnaire) – валидизированных опросников для оценки уровня контроля бронхиальной астмы и эффективности назначенной терапии, данных спирометрии с бронхолитиком и показатели суточной вариабельности пиковой скорости выдоха (ПСВ).

Определение концентрации цитокинов IL-4, IL-10, IL-17A, TNF α , IFN γ осуществляли методом проточной цитометрии с помощью тест-систем Cytometric Bead Array (BD, USA) на цитометре FACSCanto II (BD USA). Для обработки данных использовали программу FCAP3 (BD, USA).

Параметры клеточного иммунитета определялись методом проточной цитофлуориметрии с использованием набора BD Multitest 6-color TBNK (Becton Dickinson, США). Фагоцитарную активность нейтрофилов (ФАН), фагоцитарный резерв (ФР), фагоцитарное число (ФЧ) и фагоцитарного числа резерв (ФЧр), завершенность фагоцитоза изучали по методу Д.Н. Маянского с соавт. [12]. Изучение метаболической активности нейтрофилов проводилось с помощью теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТ), резерва теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТр), стимулированного теста восстановления нитросинего тетразолия (НСТст), индекса активации нейтрофилов (ИАН) и резерва индекса активации (ИАНр), стимулированного индекса активации нейтрофилов (ИАНст) по методу В.Н. Park в модификации Е.В. Шмелёва [18].

Статистическую обработку количественных данных проводили с использованием статистической программы Statistica, версия 6.1 (серия 1203 для Windows). Проверку выборки на нормальность распределения осуществляли с использованием критерия Шапиро–Уилка (для малых выборок). Данные непараметрических тестов представлены в виде медианы (Me) и значений квартильного диапазона (25%; 75%). Для оценки результатов исследований использовали непараметрические критерии Манна–Уитни и Вилкоксона. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Полученные в настоящем исследовании данные указывают на значимость про- и противовоспалительных цитокинов в патогенезе БА (табл. 1). Об этом свидетельствует разная степень повышения уровня секреции TNF α , IL-4, IL-10, IL-17A у больных БА в зависимости от степени контроля над течением заболевания.

Уровень секреции IL-4 был повышенным у пациентов с БА (второй и третьей групп) и статистически значимо отличался от показателей у здоровых добровольцев ($p < 0,001$). У пациентов с частично контролируемой астмой (группа 3) IL-4 был повышен в 2,3 раза, у пациентов с контролируемой астмой (группа 2) – в 1,8 раза, подтверждая значимость Th2 пути иммунного ответа при БА.

Степень продукции IL-10 у пациентов группы с контролируемой БА (группа 2) была статистически значимо выше, чем в группе с частичным контролем астмы (группа 3) $p < 0,001$, что позволяет рассматривать его в качестве контроля активной воспалительной реакции.

Уровень TNF α был статистически значимо повышен у пациентов с БА в обеих группах в 2,3

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С КОНТРОЛИРУЕМОЙ И ЧАСТИЧНО КОНТРОЛИРУЕМОЙ БА, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. CYTOKINE CONTENTS IN BLOOD SERUM OF PATIENTS WITH CONTROLLED OR PARTIALLY CONTROLLED BRONCHIAL ASTHMA

Показатели Indices	Группа обследованных лиц Studied Group			Достигнутый уровень значимости, p Achieved significance level, p
	Группа 1, n = 11 Group 1	Группа 2, n = 9 Group 2	Группа 3, n = 79 Group 3	
TNF α , pg/ml	47,1 (43,1; 49,3)	112,7 (108; 114,4)	109,7 (108,9; 111,5)	$p_{1-2} < 0,0294$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,165$
IL-4, pg/ml	76,6 (68,5; 81,9)	129 (120; 133,6)	166,5 (165,3; 167,8)	$p_{1-2} < 0,0001$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,001$
IL-10, pg/ml	33,1 (29,6; 36,6)	43,5 (42,3; 44)	25,5 (24,3; 26)	$p_{1-2} < 0,0286$ $p_{1-3} < 0,0021$ $p_{2-3} < 0,0001$
IL-17A, pg/ml	383,7 (280,6; 392,2)	387,8 (381,7; 391,4)	661,4 (657,8; 665,9)	$p_{1-2} < 0,6857$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} < 0,0001$
IFN γ базальный IFN γ basal pg/ml	9,8 (9,2; 10,3)	4,3 (2,5; 5,1)	3,3 (1,3; 6,2)	$p_{1-2} < 0,0009$ $p_{1-3} < 0,0009$ $p_{2-3} < 0,9117$

Примечание. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей. p – статистическая значимость различий между пациентами с БА и здоровыми добровольцами.

Note. Results are presented as median, lower, and upper quartiles. Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). P, statistical significance of the differences between patients with bronchial asthma and healthy volunteers.

раза при сравнении со здоровыми добровольцами ($p < 0,05$). Однако статистически значимых отличий между пациентами с частично контролируемой и контролируемой БА (второй и третьей) не обнаружено.

Степень активности секреции IL-17A у больных с контролируемым течением БА (группа 2) была на уровне здоровых добровольцев (группа 1). Однако пациенты, имеющие частичный контроль над симптомами (группа 3), имели статистически значимое повышение данного показателя в 2 раза по сравнению как со здоровыми лицами из первой группы, так и с пациентами из второй группы с контролируемой астмой ($p < 0,0001$).

Подобная закономерность получена и при исследовании интерферона- γ у пациентов, имеющих БА. В группе у больных с БА (2 и 3 группы) уровень базального IFN γ был статистически значимо ниже, чем у здоровых добровольцев ($p < 0,001$). У пациентов с полным контролем (группа 2) над течением заболевания IFN γ был снижен в 2,5 раза. При частичном контроле (группа 3) – в 3 раза, что подтверждает снижение врожденных механизмов иммунной защиты и наличие персистирующего аллергического воспаления за счет активации Th2-типа иммунного

ответа при БА. Уровень данного цитокина у больных БА не зависел от степени контроля.

При анализе показателей клеточного звена иммунной системы статистически значимых различий между субпопуляциями CD-лимфоцитов у здоровых и больных не выявлено, что свидетельствует об отсутствии влияния CD-позитивных клеток на контроль течения бронхиальной астмы (табл. 2).

При изучении функционального состояния клеток моноцитарно-макрофагальной системы установлены статистически значимые различия у больных БА и здоровых лиц. У больных БА (группы 2 и 3) отмечена тенденция к уменьшению резервных возможностей нейтрофильных гранулоцитов – НСТр и ИАНр в 1,9 и 2,1 раза соответственно. У пациентов с частичным контролем над течением БА (группа 3) наблюдается снижение показателя ФЧ – на 21%. У всех обследованных с БА (группы 2 и 3) выявлен низкий уровень окислительного метаболизма: ИАН снижен на 91%, ИАНр – на 54%. Уменьшение резервных возможностей нейтрофильных гранулоцитов, снижение их окислительного метаболизма в одинаковой степени характерно как для лиц с частично контролируемой БА, так и с контро-

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА У ПАЦИЕНТОВ С БА И У ЗДОРОВЫХ ДОБРОВОЛЬЦЕВ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)
TABLE 2. INDICATORS OF IMMUNE STATUS OF PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA AND HEALTHY VOLUNTEERS.

Показатель Indicators	Группа 1, n = 11 Group 1	Группа 2, n = 9 Group 2	Группа 3, n = 79 Group 3	Достигнутый уровень значимости, p Achieved significance level, p
Лейкоциты Leukocytes, %	5,7 (4,8; 6,2)	5,57 (5,4; 5,8)	7,9 (7,4; 8,3)	$p_{1-2} < 0,1$ $p_{1-3} < 0,1$ $p_{2-3} < 1$
Лимфоциты Lymphocytes, $\times 10^9/L$	31,1 (27,2; 32,6)	31,9 (30,6; 33,1)	29,3 (29; 30)	$p_{1-2} < 0,7$ $p_{1-3} < 0,7$ $p_{2-3} < 0,1$
CD3 ⁺ , %	70,6 (66,7; 72,4)	62 (57; 76)	64,1 (51,3; 73,8)	$p_{1-2} < 0,54$ $p_{1-3} < 0,7$ $p_{2-3} < 1$
CD3 ⁺ CD4 ⁺ , %	44,5 (41,4; 47,3)	36 (32,5; 48,5)	36 (27; 47)	$p_{1-2} < 0,4740$ $p_{1-3} < 0,4$ $p_{2-3} < 0,8248$
CD3 ⁺ CD8 ⁺ , %	24,7 (21,9; 26)	25 (20,8; 28,8)	22,5 (19,2; 26,8)	$p_{1-2} < 0,4625$ $p_{1-3} < 0,4706$ $p_{2-3} < 0,3476$
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	2 (1,4; 2,4)	2 (1,4; 2,4)	1,5 (1,2; 2,1)	$p_{1-2} < 0,8$ $p_{1-3} < 0,2$ $p_{2-3} < 0,21$
CD16 ⁺ , %	15,5 (14,5; 20,4)	14,5 (12,5; 18)	14 (11,7; 18,2)	$p_{1-2} < 0,8061$ $p_{1-3} < 0,6478$ $p_{2-3} < 0,8928$
CD19 ⁺ , %	15,1 (11; 18,3)	12,6 (11,1; 13,7)	14 (11,7; 18,2)	$p_{1-2} < 0,0734$ $p_{1-3} < 0,0608$ $p_{2-3} < 0,96$
Фагоцитоз Phagocytosis	51,5 (42,3; 64,8)	67 (55; 69,25)	64 (59,5; 68)	$p_{1-2} < 0,0756$ $p_{1-3} < 0,044$ $p_{2-3} < 0,9711$
ФР Phagocyte reserve	1,2 (1,2; 1,2)	1,2 (1,2; 1,3)	1,8 (1,1; 1,2)	$p_{1-2} < 0,113$ $p_{1-3} < 0,0706$ $p_{2-3} < 0,0744$
ФЧ Phagocyte count	4,8 (4,7; 5,5)	4,8 (4,1; 5)	3,8 (3,5; 3,9)	$p_{1-2} < 0,3747$ $p_{1-3} < 0,004$ $p_{2-3} < 0,0062$
ФЧР Phagocyte count reserve	1,4 (1,2; 1,5)	1,2 (1,2; 1,3)	1,3 (1,2; 1,5)	$p_{1-2} < 0,1386$ $p_{1-3} < 0,5787$ $p_{2-3} < 0,3880$
НСТ NBT test	15 (13; 18)	15 (10; 21)	15 (14; 18,5)	$p_{1-2} < 0,7970$ $p_{1-3} < 0,7564$ $p_{2-3} < 0,6033$
НСТр NBT test reserve	3,3 (2,5; 4)	1,7 (1,6; 1,9)	1,7 (1,5; 1,8)	$p_{1-2} < 0,0004$ $p_{1-3} < 0,001$ $p_{2-3} < 0,5658$
ИАН Neutrophil activation index	1,2 (0,3; 1,5)	0,2 (0,2; 0,3)	0,2 (0,2; 0,2)	$p_{1-2} < 0,0065$ $p_{1-3} < 0,0051$ $p_{2-3} < 0,3093$
ИАНр Neutrophil activation index reserve	3,6 (2,4; 3,9)	1,6 (1,5; 1,9)	1,59 (1,5; 1,63)	$p_{1-2} < 0,0001$ $p_{1-3} < 0,0001$ $p_{2-3} < 0,378$

Примечание. Результаты представлены в виде медианы, нижнего и верхнего квартилей. p – статистическая значимость различий между пациентами с БА и здоровыми добровольцами.

Note: The results are presented as median, lower, and upper quartiles. Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). p, statistical significance of the differences between patients with bronchial asthma and healthy volunteers.

лируемой БА (группы 2 и 3), то есть не зависело от степени контроля заболевания.

Обсуждение

Результаты исследований свидетельствуют о том, что развившийся при БА воспалительный процесс в легочной ткани сопровождается наличием комплекса иммунометаболических изменений, отражающих структурно-функциональные перестройки органа-мишени. Установлено, что концентрации IL-4, IL-17A возрастают более значительно в группе пациентов с отсутствием полного контроля над течением заболевания по сравнению с группой, имеющей контролируемое течение БА. Концентрация IL-17A в 2 раза выше, а IL-4 на 23% выше в 3 группе с частично контролируемым течением заболевания, по сравнению с пациентами из 1 группы. Индукция TNF α остается на статистически значимо высоком уровне в обеих группах наблюдения, превышающем в 2,3 раза группу контроля. Th2-медиаторы иммунного ответа, поддерживают персистирующее аллергическое воспаление и способствуют генерации супрессорных Th1- и Th17-клеток, которые индуцируют IL-17, TNF α . Известно, что TNF α не только участвует в защитных реакциях, но и является одним из ведущих медиаторов деструкции тканей, поэтому увеличение его количества у больных с БА может быть связано с активацией патологического метаболизма и ремоделированием дыхательных путей [3, 8, 9, 19]. Формирование Th17-фенотипа иммунного ответа детерминирует привлечение и активацию нейтрофилов, что играет важную роль на этапе контроля воспаления [7, 23, 24, 25, 11]. Сохраняющиеся высокими уровни секреции IL-4, IL-17A,

TNF α на фоне базисной противовоспалительной терапии могут свидетельствовать о неадекватном выборе лекарственных средств или развитии резистентности клеток-продуцентов к действию базисной топической глюкокортикостероидной терапии.

Снижение иммунорегуляторного фактора IL-10 в 1,5 раза относительно референсных значений у пациентов с частичным контролем над течением заболевания является прогностическим фактором активности аллергических реакций организма пациента, имеющего БА, и показателем, характеризующим степень контроля над течением заболевания [6, 7]. Снижение IFN γ у пациентов с БА подтверждается данными других исследований [10, 22] и свидетельствует о подавлении Th1-девиации в иммунной защите у пациентов с БА. Значительное влияние на контроль течения заболевания у пациентов с бронхиальной астмой оказывают показатели фагоцитарного звена иммунной защиты. Уменьшение резервных возможностей нейтрофильных гранулоцитов и показателя фагоцитарного числа свидетельствует о недостаточной поглотительной активности нейтрофилов и повышает уровень антигенной нагрузки у пациентов с БА.

Выявленные изменения иммунного статуса у больных с контролируемым и частично контролируемым течением БА, которые характеризуются повышением уровня IL-4, IL-17A, TNF α и ФАН, снижением ИАН, ФЧ, НСТр и ИАНр, позволяют рассматривать эти показатели в качестве маркеров активной воспалительной реакции; в качестве показателей, характеризующих степень контроля над течением заболевания; как критерий эффективности проводимой терапии.

Список литературы / References

1. Архипов В.В., Григорьева Е.В., Гавришина Е.В. Морфофункциональная характеристика слизистой оболочки желудка у больных с бронхиальной астмой разной степени тяжести // Пульмонология, 2011. № 6. С. 87-93. [Arkhipov V.V., Grigorieva E.V., Gavrishina E.V. Morph-functional characteristics of gastric mucosa of patients with various bronchial asthma. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2011, no. 6, pp. 87-93. (In Russ.)]
2. Архипов В.В. Новые перспективы повышения контроля над бронхиальной астмой. От науки к практике // Практическая пульмонология, 2014. № 1. С. 67-76. [Arkhipov V.V. New perspectives of increasing control over bronchial asthma. From science to practice. *Prakticheskaya pul'monologiya = Practical Pulmonology*, 2014, no. 1, pp. 67-76. (In Russ.)]
3. Геренг Е.А. Роль цитокинов в регуляции функциональной активности и популяционного статуса тучных клеток при аллергическом воспалении в бронхиальном дереве // Сибирский медицинский журнал, 2010. Т. 25, № 3, Вып. 1. С. 56-59. [Gereng E. A. The role of cytokines in regulating the functional activity and population status of mast cells during allergic inflammation in bronchial tree. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2010, Vol. 25, no. 3, Ed. 1, pp. 56-59. (In Russ.)]
4. Головоочесова Г.А. Анализ основных причин неконтролируемого течения бронхиальной астмы // Сибирский медицинский журнал, 2009. № 4. С. 128-129. [Golovochesova G.A. Analysis of the main reasons of uncontrolled bronchial asthma. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal*, 2009, no. 4, pp. 128-129. (In Russ.)]
5. Емельянов А.В. Аллергический ринит и бронхиальная астма в реальной клинической практике: результаты Российского многоцентрового исследования // Российский аллергологический журнал, 2012. № 1.

С. 29-36. [Emelianov A.V. Allergic rhinitis and bronchial asthma in real clinical practice: results of Russian multi-center research. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergologic Journal*, 2012, no. 1, pp. 29-36. (In Russ.)]

6. Иванов В.А., Сорокина Л.Н., Минеев В.Н., Шестакова Н.Э., Быстрова А.А., Трофимов В.И. Сочетание бронхиальной астмы и сахарного диабета: синергизм или антагонизм? // Пульмонология, 2014. № 6. С. 103-107. [Ivanov V.A., Sorokina L.N., Mineev V.N., Shestakova N.E., Bystrova A.A., Trofimov V.I. Simultaneous bronchial asthma and diabetes: synergy or antagonism? *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2014, no. 6, pp. 103-107. (In Russ.)]

7. Кобалава Ж.Д., Шаварова Е.К., Дмитрова Т.Б., Богомаз А.В. Современные перспективы в лечении бронхиальной астмы // Клиническая фармакология и терапия, 2011. № 20 (5). С. 17-24. [Kobalava Zh.D., Shavarova E.K., Dmitrova T.B., Bogomaz A.V. Contemporary perspectives of treating bronchial asthma. *Klinicheskaya farmakologiya i terapiya = Clinical Pharmacology and Therapy*, 2011, no. 20 (5), pp. 17-24. (In Russ.)]

8. Конищева А.Ю., Гервазиева В.Б., Лаврентьева Е.Е. Особенности структуры и функции респираторного эпителия при бронхиальной астме // Пульмонология, 2012. № 5. С. 85-90. [Konischeva A.Yu., Gervazieva V.B., Lavrentyeva E.E. Structure and functions of respiratory epithelium in bronchial asthma. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2012, no. 5, pp. 85-90. (In Russ.)]

9. Лазуткина Е.Л. Особенности гуморального и клеточного иммунитета при аллергической и смешанной форме бронхиальной астмы у больных Приамурья // Материалы VI Съезда врачей-пульмонологов Сибири и Дальнего Востока. Благовещенск, 2015. С. 73-76. [Lazutkina E.L. Humoral and cell immunity in allergic and mixed form of bronchial asthma in patients of Priamurye. *Materials of VI Meeting of pulmonologists of Siberia and Far East. Blagoveshensk*, 2015, pp. 73-76. (In Russ.)]

10. Лазуткина Е.Л., Лазаренко Л.Л., Ландышев Ю.С., Цырендоржиев Д.Д., Ландышев С.Ю. Эффективность применения индуктора интерферона в период обострения бронхиальной астмы на фоне острой респираторной вирусной инфекции // Бюллетень физиологии и патологии дыхания, 2012. Вып. 43. С. 23-27. [Lazutkina E.L., Lazarenko L.L., Landyshev Yu. R., Tsyrendorzhiev D.D., Landyshev R.Yu. Effectiveness of using interferon inductor for bronchial asthma and acute respiratory viral infection. *Byulleten' fiziologii i patologii dykhaniya = Bulletin of Respiratory Physiology and Pathology*, 2012, Ed. 43, pp. 23-27. (In Russ.)]

11. Лобанова Е.Г., Калинина Е.П., Денисенко Ю.К., Антонок М.В. Роль девиации субпопуляций Т-хелперов 17 типа при хронической обструктивной болезни легких // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2015. № 11. С. 216-220. [Lobanova E.G., Kalinina E.P., Denisenko Yu.K., Antonyuk M.V. Role of deviations of T-helper type 17 subpopulations in chronic obstructive lung disease. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research*, 2015, no. 11, pp. 216-220. (In Russ.)]

12. Маянский Д.Н., Щербаков В.И., Макарова О.П. Комплексная оценка функции фагоцитов при воспалительных заболеваниях. Новосибирск, 1988. 24 с. [Mayansky D.N., Scherbakov V.I., Makarova O.P. Complex assessment of phagocyte functions in inflammatory diseases]. Novosibirsk, 1988. 24 p.

13. Ненашева Н.М. Это трудное слово «комплайнс», или как можно повысить приверженность лечению при бронхиальной астме // Астма и аллергия, 2013. № 2. С. 16-18. [Nenasheva N.M. The difficult word «compliance», or how it is possible to increase the effectiveness of bronchial asthma treatment. *Asthma i allergiya = Asthma and Allergy*, 2013, no. 2, pp. 16-18. (In Russ.)]

14. Ненашева Н.М. Новые возможности достижения контроля астмы с помощью тiotропия бромида // Эффективная фармакотерапия. Пульмонология и оториноларингология, 2014. № 2 (29). С. 4-13. [Nenasheva N.M. New opportunities of controlling asthma using tiotropium bromide. *Effektivnaya farmakoterapiya. Pul'monologiya i otorinolaringologiya = Effective Pharmacotherapy. Pulmonology and Otolaryngology*, 2014, no. 2 (29), pp. 4-13. (In Russ.)]

15. Ненашева Н.М. Бронхиальная астма и сопутствующие заболевания: в фокусе аллергический ринит // Практическая пульмонология, 2014. № 1. С. 2-8. [Nenasheva N.M. Bronchial asthma and accompanying diseases: allergic rhinitis in focus. *Prakticheskaya pul'monologiya = Practical Pulmonology*, 2014, no. 1, pp. 2-8. (In Russ.)]

16. Респираторная медицина: Руководство // Под ред. А.Г. Чучалина. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2007. Т. 1. 797 с. [Respiratory Medicine: Guide (Edited by Chuchalin A.G.). Moscow: GEOTAR-Media, 2007, Vol. 1. 797 p.

17. Терехова Е.П. Оптимизация терапии бронхиальной астмы с использованием длительно действующего антихолинэргического препарата тiotропия бромида // Consilium medicum. Болезни органов дыхания, 2014. № 1. С. 16-23. [Terekhova E.P. Optimizing bronchial asthma therapy using long lasting anticholinergic tiotropium bromide. *Sonsilium medicum. Bolezni organov dykhaniya = Consilium Medicum. Respiratory Diseases*, 2014, no. 1, pp. 16-23. (In Russ.)]

18. Шмелев Е.В., Бумагина Г.К., Митеров П.П. Модификация метода Park // Лабораторное дело, 1979. № 9. С. 13-15. [Shmelev E.V., Bumagina G.K., Miterov P.P. Modifying Park method. *Laboratornoe delo = Laboratory Business*, 1979, no. 9, pp. 13-15. (In Russ.)]

19. Chen Y., Wu H., Winnall W.R. Tumour necrosis factor α stimulates human neutrophils to release preformed activin A. *Immunology and Cell Biology*, 2011, Vol. 89, no. 8, pp. 889-896.

20. Giovannini-Chami L., Albertini M., Scheinmann P., de Blic J. New insights into the treatment of severe asthma in children. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 167-173.

21. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). Update 2014 // <http://www.ginasthma.org>
22. Horn S.R.G., Huber J.P., Farrar J.D. Type I interferon regulates acute IL-5 and IL-13 expression in human memory CD4⁺ T cells. *Cytokine*, 2013, Vol. 63, no. 3, pp. 265-267.
23. Irvin C., Zafar I., Good J., Rollins D., Christianson C., Gorska M.M., Martin R.J., Alam R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *Journal of Allergy Clinical Immunology*, 2014, Vol. 134, no. 5, pp. 1175-1186.
24. Newcomb D.C., Cephus J.Y., Boswell M.G., Fahrenholz J.M., Langley E.W., Feldman A.S., Zhou W., Dulek D.E., Goleniewska K., Woodward K.B., Sevin C.M., Hamilton R.G., Kolls J.K., Peebles R.S.Jr. Estrogen and progesterone decrease let-7f microRNA expression and increase IL-23/IL-23 receptor signaling and IL-17A production in patients with severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2015, Vol. 136, no. 4, pp. 1025-1034.
25. Vroman H., van den Blink B., Kool M. Mode of dendritic cell activation: the decisive hand in Th2/Th17 cell differentiation. Implications in asthma severity? *Immunobiology*, 2015, Vol. 220, no. 2, pp. 254-261.

Авторы:

Барабаш Е.Ю. — аспирант, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Калинина Е.П. — д.м.н., старший научный сотрудник, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Гвозденко Т.А. — д.м.н., директор, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Денисенко Ю.К. — д.б.н., заведующая лабораторией биомедицинских исследований, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Новгородцева Т.П. — д.б.н., заместитель директора по научной работе, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Антонюк М.В. — д.м.н., заведующая лабораторией восстановительного лечения, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Ходосова К.К. — аспирант, Владивостокский филиал ФГБНУ «Дальневосточный научный центр физиологии и патологии дыхания» — Научно-исследовательский институт медицинской климатологии и восстановительного лечения, г. Владивосток, Россия

Authors:

Barabash E. Yu., PhD Student, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Kalinina E. P., PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Gvozdenko T. A., PhD, MD (Medicine), Director, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Denisenko Yu. K., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Biomedical Research, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Novgorodtseva T. P., PhD, MD (Biology), Deputy Director for Research, The Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Antonyuk M. V., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Rehabilitative Treatment, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Khodosova K. K., PhD Student, Research Institute of Medical Climatology and Rehabilitation Treatment, Vladivostok Branch, Far Eastern Scientific Center of Respiratory Physiology and Pathology, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 22.05.2016
Отправлена на доработку 31.05.2016
Принята к печати 02.09.2016

Received 22.05.2016
Revision received 31.05.2016
Accepted 02.09.2016

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПНЕВМОКОККОВОЙ ВАКЦИНЫ У ДЕТЕЙ С РАЗЛИЧНЫМИ ПРОЯВЛЕНИЯМИ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИИ

Довгалюк И.Ф.², Дрозденко Т.С.¹, Старшинова А.А.², Корнева Н.В.²,
Харит С.М.¹

¹ ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

² ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Сопутствующая инфекционная патология снижает уровень неспецифической реактивности организма, создавая тем самым неблагоприятный фон в течении туберкулезной инфекции. Создание специфического иммунитета против наиболее часто встречающихся в детском возрасте инфекционных заболеваний, к которым относится и пневмококковая инфекция, возможно не только у детей с латентной туберкулезной инфекцией, но и у пациентов с туберкулезом органов дыхания. В исследовании приводятся данные после проведения иммунизации против пневмококковой инфекции препаратом «Пневмо23» у 35 детей в возрасте от 3 до 14 лет с различными проявлениями туберкулезной инфекции, находившимися на обследовании и лечении в ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России. Эффективность вакцинации оценивали по числу эпизодов ОРИ, острых средних отитов и внебольничных пневмоний как наиболее распространенных форм пневмококковой инфекции за год до прививки и через год после нее. Клиническая безопасность вакцинации определялась в соответствии с числом возникающих в поствакцинальном периоде общих и местных реакций. Частота развития общих и местных реакций достоверно не различалась в группах и не превышала значений, указанных в инструкции к препарату. Гладкое течение поствакцинального периода наблюдалось у 94,3% привитых. Не отмечалось негативного влияния на течение туберкулезной инфекции. Во 2-й группе все дети имели неосложненное течение поствакцинального периода. В обеих группах отмечалось статистически значимое увеличение уровня IgG к 14–45-му дню вакцинации. Вакцинация ППВ23 не сопровождалась развитием поствакцинальных осложнений и не вызывала ухудшения течения туберкулезной инфекции. Вакцинация против пневмококковой инфекции эффективна в снижении частоты острых респираторных инфекций как детей, инфицированных МБТ, так и с локальными проявлениями туберкулеза.

Ключевые слова: вакцинация, пневмококковая вакцина, дети, туберкулезная инфекция, диагностика, иммунитет

Адрес для переписки:

Старшинова Анна Андреевна
ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ
191036, Россия, Санкт-Петербург, Лиговский пр., 2-4.
Тел.: 8 (905) 204-38-61.
Факс: 8 (812) 579-25-73.
E-mail: starshinova_777@mail.ru

Address for correspondence:

Starshinova Anna A.
St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology
191036, Russian Federation, St. Petersburg, Ligovsky ave, 2-4.
Phone: 7 (905) 204-38-61.
Fax: 7 (812) 579-25-73.
E-mail: starshinova_777@mail.ru

Образец цитирования:

И.Ф. Довгалюк, Т.С. Дрозденко, А.А. Старшинова, Н.В. Корнева, С.М. Харит «Эффективность пневмококковой вакцины у детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 73–80.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-73-80

© Довгалюк И.Ф. и соавт., 2017

For citation:

I.F. Dovgalyuk, T.S. Drozdenko, A.A. Starshinova, N.V. Korneva, S.M. Kharith "Efficiency of pneumococcal vaccine in children with different patterns of tuberculosis infection", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 73–80. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-73-80

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-73-80>

EFFICIENCY OF PNEUMOCOCCAL VACCINE IN CHILDREN WITH DIFFERENT PATTERNS OF TUBERCULOSIS INFECTION

Dovgalyuk I.F.^b, Drozdenko T.S.^a, Starshinova A.A.^b, Korneva N.V.^b, Kharith S.M.^a

^a Research Institute of Pediatric Infections, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Concomitant infection is known to decrease non-specific immunity levels, thus negatively affecting clinical outcomes in tuberculosis patients. Development of specific immune response against most common pediatric infections, e.g., pneumococcal infection, is possible both in children with latent tuberculosis and in respiratory tuberculosis. The study contains data concerning results of immunization with Pneumo23 vaccine against pneumococcal infection in 35 children (3 to 14 years old) with different manifestations of MBT infection observed at the St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology. The vaccination efficiency was evaluated by incidence of acute respiratory infections, acute otitis media, and community pneumonias within one year before and after vaccination performed. Clinical safety of the vaccination was determined as the number of general and local reactions registered following vaccination.

Incidence of post-vaccinal reactions did not differ significantly between the clinical groups and did not exceed the values reported by the vaccine manufacturer. Post-vaccinal period was event-free in 94.3% of vaccinated children, without any negative effects upon the underlying tuberculosis process. In Group 2, all the children were complication-free over the post-vaccinal period. Both groups exhibited a statistically significant increase of IgG levels by the post-vaccination day 14...45. The PPV23 vaccination was not followed by post-vaccinal complications, or worsening of tuberculosis infection. Hence, anti-pneumococcal vaccination is effective for prevention of acute respiratory infections, both in MBT-infected children and in patients with local tuberculosis affection.

Keywords: vaccination, pneumococcal vaccine, children, tuberculosis infection diagnostics, immunity

Введение

Всемирная организация здравоохранения рассматривает вакцинацию в качестве одного из факторов достижения здоровья нации. Необходимость защиты от управляемых инфекций детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции была доказана многими исследователями давно, однако, в связи с отсутствием достаточного фактического материала, показывающего переносимость и эффективность введения различных вакцин детям с туберкулезной инфекцией, а также вследствие несогласованности мнений фтизиатров и специалистов по иммунопрофилактике и неточности формулировок в нормативных документах, на практике их не вакцинируют [2, 7]. В последнем утвержденном Национальном Календаре профилактических прививок (Приказ МЗ РФ от 21.03.2014 г. № 125н) туберкулез как противопоказание к вакцинации также не упоминается. Однако, в Приказе МЗ РФ № 109 «О совершенствовании противотуберкулезных мероприятий» указано, что в случае установления «виража» туберкулиновых реакций, а также гиперергической или усилива-

ющейся реакции на туберкулин, без функциональных и локальных проявлений туберкулеза у детей, профилактические прививки проводятся не раньше, чем через 6 месяцев.

Актуальность проблемы вакцинации детей с туберкулезной инфекцией связана с сохраняющимся неблагополучием в отношении заболеваемости туберкулезом как взрослых, являющихся источником заражения туберкулезной инфекцией детей, так и детского населения [1, 4, 5, 6]. Ежегодно активным туберкулезом заболевает около 5,5 тысяч детей, более 500 000 детей и подростков состоят на учете в группах риска противотуберкулезных учреждений [3, 8]. При возникновении неблагоприятной эпидемической ситуации по контролируемым инфекциям больные туберкулезом, особенно в закрытых коллективах (санатории, больницы), создают «группу риска» по заболеванию ими, а также по обострению основного заболевания, при этом эффект от проводимой химиотерапии значительно снижается. Доказано усугубляющее действие на течение туберкулеза таких инфекций, как корь, коклюш, пневмококковая и другие инфекции, которые

способствуют утяжелению течения туберкулезной инфекции [7, 9, 10].

В последние годы в России проводится иммунизация детей с положительными иммунологическими тестами против гриппа, пневмококковой инфекции [2]. Однако в литературе нет сведений об эффективности проведения вакцинации детей как заболевших туберкулезом, так и с латентной туберкулезной инфекцией.

Отсутствие четких рекомендаций по вакцинации детей с латентной туберкулезной инфекцией и больных туберкулезом на фазе обратного развития процесса приводит к медицинским отводам от прививок, что является следствием отсутствия индивидуальной защиты от управляемых инфекций у детей и снижению коллективного иммунитета. Все это определяет цель нашего исследования, включающего проведение клинико-иммунологических исследований, оценку клеточного, гуморального ответа и эффективность иммунного ответа после введения полисахаридной 23-валентной пневмококковой вакцины (Пневмо23) у детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции.

Материалы и методы

Проведена иммунизация против пневмококковой инфекции препаратом «Пневмо23» (ППВ23) 35 детей в возрасте от 3 до 14 лет, отнесенных к категории часто и длительно болеющих ОРЗ, находившихся на обследовании в амбулаторно-поликлиническом отделении и отделении терапии туберкулеза легких у детей ФГБУ «СПб НИИФ» Минздрава России за период с 2013

по 2015 год. Перед иммунизацией всем детям был выполнен стандартный комплекс фтизиатрического обследования, проведением пробы с аллергеном туберкулезным рекомбинантным и рентгенологическими (МСКТ) методами обследования. Проведен анализ результатов проспективного исследования с сравнением результатов вакцинации в двух группах детей: 1-я группа (n = 24) – с латентной туберкулезной инфекцией, 2-я группа (n = 11) – с туберкулезом органов дыхания (ТОД). В 1-ой группе прививки проводили как на фоне превентивной химиотерапии. Во 2-ой – на фоне основного курса терапии с применением 4-х препаратов в интенсивной фазе и фазе продолжения терапии более 4-6 месяцев. Критериями эффективности лечения служили: положительная клинико-лабораторная (уменьшение проявлений интоксикационного синдрома, снижение активности туберкулеза по данным пробы с Диаскинтестом) рентгенологическая динамика специфического процесса. Проведен комплекс иммунологического обследования с определением субпопуляций лимфоцитов (CD3⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD16⁺, CD20⁺, CD25⁺, CD95⁺) до прививки, на 14-й, 30-й и 45-й дни после нее, а также изучением уровня цитокинов IL-1, IL-4, IL-6, IFN γ , TNF α в сыворотке крови методом иммуноферментного анализа (ИФА); содержание Ig классов А, М, G – турбидиметрическим методом, IgE – методом твердофазного ИФА. Статистическая обработка полученных результатов проводилась с применением пакета программ Statistica 6,0 (StatSoft, США). Для проверки гипотезы о различии групп использованы непараметри-

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВАКЦИНАЛЬНОГО ПРОЦЕССА У ДЕТЕЙ В ГРУППАХ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ППВ23
TABLE 1. FEATURES OF VACCINATION PROCESS AFTER PPV23 VACCINATION FOR DIFFERENT GROUPS

Группы детей Groups of children	Течение вакцинального процесса Outcomes of vaccination process (abs./%)						Местные реакции Local reactions (abs./%)	
	Гладкое Non-complicated		Осложненное Complicated		Обострение основного процесса Exacerbation of primary disease			
1-ая группа (n = 24) Group 1	22	91,6	2	8,3	–	–	2	8,3
2-ая группа (n = 11) Group 2	11	100	–	–	–	–	1	9,1
Всего (n = 35) Total	33	94,3	2		–	–	3	8,6

ТАБЛИЦА 2. ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОСЛЕ ПРОВЕДЕНИЯ ВАКЦИНАЦИИ ППВ23 ДЕТЯМ В I-ОЙ ГРУППЕ (С ЛАТЕНТНОЙ ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ)

TABLE 2. TIME-DEPENDENT CHANGES OF IMMUNOLOGICAL INDEXES FOLLOWING PPV23 VACCINATION IN THE 1ST GROUP (CHILDREN WITH LATENT TB INFECTION)

Показатели Me Median values (95% CI)	Сроки обследования Terms of survey		
	До прививки Before vaccination	14 день Day 14	45 день Day 45
Лейкоциты Leukocytes, $\times 10^9/L$	6,9 (5,8-7,3)	6,4 (5,8-8,5)	7,1 (5,9-10,7)
Лимфоциты Lymphocytes, %	39 (31,5-47,5)	39 (25-52,5)	37 (32-41)
Лимфоциты Lymphocytes, $\times 10^9/L$	2,6 (2,0-3,2)	3,0 (1,7-3,2)	2,3 (2,2-3,4)
CD3 ⁺ , %	69 (64,5-73)	64 (56-71,5)	68 (66-69)
CD3 ⁺ , $\times 10^9/L$	1,8 (1,2-2,1)	2,0 (1,4-2,2)	2,0 (1,5-2,3)
CD4 ⁺ , %	38,5 (34-41,5)	35 (34-40)	37 (32-42)
CD4 ⁺ , $\times 10^9/L$	1,0 (0,7-1,3)	1,1 (0,7-1,5)	1,0 (0,9-1,4)
CD8 ⁺ , %	27 (21,5-31)	27 (25-28)	25 (22-29)
CD8 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,7 (0,5-0,8)	0,7 (0,5-1,0)	0,8 (0,5-0,8)
CD16 ⁺ , %	6,5 (5-11)	8 (5-15)	10,5 (3-17)
CD16 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,4)	0,2 (0,1-0,5)
CD20 ⁺ , %	18,5 (14-23)	21 (15-24)	16 (14-26)
CD20 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,5 (0,3-0,7)	0,7 (0,4-0,8)	0,5 (0,3-0,6)
CD25 ⁺ , %	9 (6,5-13)	10 (6-12)	10 (5-14)
CD25 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,2 (0,1-0,4)	0,2 (0,1-0,4)	0,3 (0,2-0,4)
CD95 ⁺ , %	20 (15-27)	20 (17-27)	23 (18-29)
CD95 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,4 (0,3-0,6)	0,6 (0,4-0,8)	0,7 (0,5-0,9)
IgM, g/l	0,7 (0,6-1,0)	1,0 (0,9-1,2)	1,0 (0,8-1,2)
IgG, g/l	7,6 (6,4-10,8)*	10,0 (7,0-13,5)*	11,2 (7,8-15,6)*
IgA, g/l	0,8 (0,6-1,3)	0,8 (0,7-1,4)	1,0 (0,8-1,3)
IgE, IU/l	25 (13,5-106)	15 (10-28)	16 (11-28)

Примечание. * – $p < 0,05$ (по Вилкоксоу).

Note. * – $p < 0.05$ (Wilcoxon criterion).

ТАБЛИЦА 3. ДИНАМИКА ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ППВ23 У ДЕТЕЙ ВО II-ОЙ ГРУППЕ (БОЛЬНЫЕ ТУБЕРКУЛЕЗОМ)

TABLE 3. TIME-DEPENDENT CHANGES OF IMMUNOLOGICAL INDEXES FOLLOWING PPV23 VACCINATION IN THE 2ND GROUP (CHILDREN WITH TB INFECTION)

Показатели Me Median values (95% CI)	Сроки обследования Terms of survey		
	До прививки Before vaccination	14 день Day 14	45 день Day 45
Лейкоциты Leukocytes, $\times 10^9/L$	5,0 (4,5-6,5)	6,9 (3,8-11,3)	7,8 (6,0-9,3)
Лимфоциты Lymphocytes, %	26,5 (22-35)	35 (27-42)	37 (15-38)
Лимфоциты Lymphocytes, $\times 10^9/L$	1,4 (1,1-2,1)	2,8 (1,8-3,1)	2,2 (1,2-3,5)
CD3 ⁺ , %	68 (64-76)	68,5 (63-69)	73 (66-74)
CD3 ⁺ , $\times 10^9/L$	1,0 (0,7-1,4)	1,9 (1,2-2,1)	1,6 (0,9-2,3)
CD4 ⁺ , %	36,5 (31-50)	33,5 (29-49)	46 (23-54)
CD4 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,6 (0,4-0,7)	0,9 (0,8-1,0)	0,8 (0,5-1,2)
CD8 ⁺ , %	25 (24-30)	24,5 (21-29)	23 (17-36)
CD8 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,4 (0,2-0,6)	0,7 (0,3-1,1)	0,4 (0,3-1,3)
CD16 ⁺ , %	9,5 (5-15)	11,5 (9-17)	11 (5-22)
CD16 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,2 (0,1-0,2)	0,4 (0,2-0,5)	0,1 (0,1-0,8)
CD20 ⁺ , %	16,5 (15-19)	16 (14-21)	12 (10-21)
CD20 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,2 (0,2-0,3)	0,4 (0,3-0,6)	0,4 (0,1-0,5)
CD25 ⁺ , %	10 (6,0 -13)	7 (6-9)	8,5 (6,5-15)
CD25 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,2 (0,1-0,3)	0,2 (0,1-0,2)	0,2 (0,1-0,2)
CD95 ⁺ , %	27,5 (17-33)	30 (15-40)	32 (16-41)
CD95 ⁺ , $\times 10^9/L$	0,3 (0,3-0,7)	0,9 (0,2-1,2)	0,4 (0,4-1,4)
IgM, g/l	0,6 (0,5-0,8)	1,2 (0,7-1,8)	0,9 (0,6-1,3)
IgG, g/l	9,6 (9,4-10,8)	13,2 (11,4-14,2)*	11,8 (10,2-14,9)*
IgA, g/l	1,5 (1,3-1,8)	1,8 (1,2-2,1)	1,6 (1,3-1,8)
IgE, IU/l	57,5 (45-119)	22 (6-90)	21 (6-53)

Примечание. * – $p < 0,05$ (по Вилкоксоу).

Note. * – $p < 0.05$ (Wilcoxon criterion).

ТАБЛИЦА 4. СОДЕРЖАНИЕ ЦИТОКИНОВ В ДИНАМИКЕ ПОСЛЕ ВАКЦИНАЦИИ ППВ 23 В ГРУППАХ СРАВНЕНИЯ
TABLE 4. CYTOKINE LEVELS AT DIFFERENT TERMS AFTER PPV 23 VACCINATION IN COMPARISON GROUPS

Показатели Me Median values (95% CI)	Группы Groups	Сроки обследования Terms of survey		
		До прививки Before vaccination	14 день 14 day	45 день Day 45
IL-1, pg/ml	1-ая 1 st	144,5 (37,5-250,5)	191,3 (25-379)	103 (16-148)
	2-ая 2 nd	282 (0-415)*	261 (168-264)	27 (16-148)*
IL-4, pg/ml	1-ая 1 st	5,1 (0-6,5)	11,6 (0-19)	2,2 (0-19)
	2-ая 2 nd	17 (0-20)	24 (18-36)	12 (0-22,2)
IL-6, pg/ml	1-ая 1 st	7,8 (0-11,5)	8,9 (0-15)	11,4 (0-13)
	2-ая 2 nd	11,3 (0-32)	3,8 (0-17)	13,2 (0-22)
IFN γ , pg/ml	1-ая 1 st	125,3 (21,5-171,5)*	78,1 (0-161)*	20,0 (0-60)*
	2-ая 2 nd	65,7 (0-136)*	22 (0-44)	3,7 (0-26)
TNF α , pg/ml	1-ая 1 st	2,2 (0-14)	1,4 (0-10)	1,7 (0-11)
	2-ая 2 nd	1,5 (0-13)	2,1 (0-26)	1,6 (0-8)

Примечание. * – $p < 0,05$ (по Вилкоксоу).

Note. * – $p < 0.05$ (Wilcoxon criterion).

ческие методы: Mann–Whitney U-test и Wilcoxon matched pair test. Статистически достоверными различия считались при $p < 0,05$. Исследование проводилось в рамках государственного задания «Значение иммуногенетических маркеров системы HLA и иммунологических особенностей организма в прогнозе развития генерализованных форм инфекции у детей».

Результаты и обсуждение

В поствакцинальном периоде общие реакции наблюдались у 3-х из всех 35 привитых детей (8,6%). В 1-ой группе общая реакция в виде повышения температуры до 38 °C в течение 2-х суток после вакцинации наблюдалась у 2-х из 24 пациентов (8,3%). Во 2-ой группе у одного ребенка из 11 детей (9,1%) была отмечена сильная вакцинальная реакция (повышение температуры до 39,5 °C) в первые сутки после иммунизации. Местные нормальные вакцинальные реакции (покраснение, уплотнение в месте введения

не более 5 см) были отмечены у 3 детей из всех 35 привитых детей (8,6%), у двоих детей из 1-ой группы (8,3%), у одного ребенка из 2-ой группы (9,1%). Частота развития общих и местных реакций достоверно не различалась в группах и не превышала значений, указанных в инструкции к препарату (1-10%) (табл. 1).

Всем детям после вакцинации проводилось последующее наблюдение у фтизиатра с выполнением основных методов обследования (клиническое состояние, туберкулиновые кожные пробы, рентгенологический контроль). Наблюдение в динамике не выявило неблагоприятного течения туберкулезной инфекции ни у одного ребенка.

Для оценки клинико-эпидемиологической эффективности вакцинации ППВ23 анализировались анамнестические данные: число эпизодов ОРИ, острых средних отитов и внебольничных пневмоний, как наиболее распространенных в детской популяции форм пневмококковой ин-

фекции, за предыдущий год и через год после вакцинации.

Проведен анализ результатов комплексного иммунологического обследования, которое показало, что после иммунизации полисахаридной пневмококковой вакциной статистически значимых изменений в субпопуляциях лимфоцитов не выявлено ни в одной из групп (табл. 2 и 3).

В обеих группах отмечалось статистически значимое увеличение уровня IgG к 14-45 дню вакцинации, в 1-ой группе к 45 дню, также как и во 2-ой группе, с 9,6 г/л (9,4-10,8 г/л) до 13,2 г/л (11,4-14,2 г/л) и 11,8 г/л (10,2-14,9 г/л) соответственно, $p = 0,03$.

В поствакцинальном периоде выявлено снижение уровня IFN γ и IL-1 в обеих группах (табл. 4).

Таким образом, после иммунизации пневмококковой вакциной (ППВ23) общие реакции наблюдались только в 8,6% случаев без достоверных различий в группах. Частота развития общих и местных реакций достоверно не различалась в группах и не превышала значений, указанных в инструкции к препарату (1-10%). В поствакцинном периоде исследование субпопуляции

лимфоцитов статистических различий в группах не выявило. Однако отмечалось статистически значимое увеличение уровня IgG к 14-45 дню вакцинации и снижение уровня IFN γ и IL-1 в обеих группах.

Заключение

Представленные данные подтверждают безопасность и эффективность введения вакцины ППВ23 детям с различными проявлениями туберкулезной инфекции при условии ее благоприятного течения.

Вакцинация ППВ23 не сопровождалась развитием поствакцинальных осложнений и не вызывала ухудшения различных проявлений туберкулезной инфекции. Вакцинация против пневмококковой инфекции эффективна в снижении частоты острых респираторных инфекций как детей, инфицированных МБТ, так и с локальными проявлениями туберкулеза, что может служить основанием для изменения подхода к проведению вакцинации детей с различными проявлениями туберкулезной инфекции.

Список литературы / References

1. Довгалюк И.Ф., Корнева Н.В., Старшинова А.А., Овчинникова Ю.Э., Ананьев С.М. Клинико-эпидемиологические особенности туберкулеза у детей на территориях Северо-Западного региона России при внедрении в диагностику туберкулеза кожной пробы с Диаскинтестом и компьютерной томографии // Туберкулез и болезни легких, 2015. № 1. С. 4-9. [Dovgalyuk I.F., Korneva N.V., Starshinova A.A., Ovchinnikova Yu.E., Anan'ev S.M. Clinical and epidemiological characteristics of registered childhood tuberculosis cases in North-Western region of Russia when introducing a tuberculosis diagnosis complex using Diaskintest and multislice spiral computed tomography. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2015, no. 1, pp. 4-9. (In Russ.)]
2. Костинов М.П. Вакцинация детей с нарушениями состояния здоровья. 4-е изд. М.: М-пресс, 2013. 432 с. [Kostinov M.P. Vaccination of children with impaired health status. 4th ed]. Moscow: M-press, 2013. 432 p.
3. Нечаева О.Б. Туберкулез в Российской Федерации: заболеваемость и смертность // Медицинский алфавит (Эпидемиология и гигиена), 2013. № 4 (24). С. 7-12. [Tuberculosis in the Russian Federation: morbidity and mortality. *Meditsinskiy alfavit (Epidemiologiya i Gigiena) = Medical Alphabet (Epidemiology and Hygiene)*, 2013, Vol. 24, no. 4, pp. 7-12. (In Russ.)]
4. Овчинникова Ю.Э., Довгалюк И.Ф., Старшинова А.А., Буцацкая Л.А. Причины хронического течения туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов у детей, особенности клинических проявлений и терапии // Туберкулез и болезни легких, 2010. Т. 87, № 1. С. 40-44. [Ovchinnikova Yu.E., Dovgalyuk I.F., Starshinova A.A., Buchackaja L.A. Causes of chronic tuberculosis of intrathoracic lymph nodes in children, the specific features of clinical manifestations and therapy. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2010, Vol. 87, no. 1, pp. 40-44. (In Russ.)]
5. Старшинова А.А., Корнева Н.В., Довгалюк И.Ф. Современные иммунологические тесты в диагностике туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов у детей // Туберкулез и болезни легких, 2011. Т. 88, № 3. С. 170-171. [Starshinova A.A., Korneva N.V., Dovgalyuk I.F. Tuberculosis epidemiological parameters in children in some areas of the North-Western Federal district. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2011, Vol. 88, no. 3, pp. 170-171. (In Russ.)]

6. Старшинова А.А., Павлова М.В., Скворцова Л.А., Довгалюк И.Ф. Подход к диагностике у детей туберкулеза внутригрудных лимфатических узлов парааортальной группы // Туберкулез и болезни легких, 2007. Т. 84, № 12. С. 14-17. [Starshinova A.A., Pavlova M.V., Skvortsova L.A., Dovgalyuk I.F. The approach to the diagnosis of tuberculosis of intrathoracic lymph nodes para-aortic group in children. *Tuberkulez i bolezni legkikh = Tuberculosis and Lung Diseases*, 2007, Vol. 84, no. 12, pp. 14-17. (In Russ.)]
7. Таточенко В. К. Вакцинопрофилактика управляемых инфекций у детей, инфицированных микобактериями туберкулеза // Туберкулез и вакцинопрофилактика, 2002. № 1 (19). С. 14-16. [Tatochenko V.K. Vaccine-preventable diseases in children infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberkulez i vaksino profilaktika = Tuberculosis and Vaccinal Prevention*, 2002, Vol. 19, no. 1, pp. 14-16. (In Russ.)]
8. Шилова М.В. Эпидемическая обстановка с туберкулезом в Российской Федерации и сдерживающие факторы ее дальнейшего улучшения // Медицинский алфавит. (Эпидемиология и гигиена), 2014. Т. 1, № 4. С. 50-56. [Shilova M.V. Tuberculosis epidemic situation and constraints to further its improve in Russian Federation. *Meditsinskiy alfavit (Epidemiologiya i Gigiena) = Medical Alphabet (Epidemiology and Hygiene)*, 2014, Vol. 1, no. 4, pp. 50-56. (In Russ.)]
9. Al-Saadi A.K., Muhsin Mohammad A.S. Effect of measles infection on cellular immunity in tuberculosis patients. *J. of Clinical Immunology and Immunopathology Research*, 2011, Vol. 3, no. 2, pp. 22-24.
10. Lee C.H., Lee E.G., Lee J.Y. The incidence of tuberculosis after a measles outbreak. *Clin. Infect. Dis.*, 2008, Vol. 46, pp. 902-904.

Авторы:

Довгалюк И.Ф. — д.м.н., профессор, руководитель направления «Фтизиопедиатрия», ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Дрозденко Т.С. — аспирант, ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

Старшинова А.А. — д.м.н., ведущий научный сотрудник, ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Корнева Н.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, ФГБУ «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт фтизиопульмонологии» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Харит С.М. — д.м.н., профессор, руководитель отдела вакцинопрофилактики, ФГБУ «Научно-исследовательский институт детских инфекций» Федерального медико-биологического агентства России, Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Dovgalyuk I.F., PhD, MD (Medicine), Professor, Chief, «Children Phthisiatry» Research Direction, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Drozdenko T.S., Postgraduate Student, Research Institute of Pediatric Infections, St. Petersburg, Russian Federation

Starshinova A.A., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, St. Petersburg Research Institute of Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Korneva N.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, St. Petersburg Research Institute for Phthisiopulmonology, St. Petersburg, Russian Federation

Kharith S.M., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Vaccination Department, Research Institute of Pediatric Infections, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 17.10.2016
Отправлена на доработку 20.10.2016
Принята к печати 06.12.2016

Received 17.10.2016
Revision received 20.10.2016
Accepted 06.12.2016

ИНГИБИРОВАНИЕ ЭКСПРЕССИИ АКТИВИРУЮЩЕГО РЕЦЕПТОРА NKG2D НА НК-КЛЕТКАХ РЕКОМБИНАНТНЫМ БЕЛКОМ MICA

Абакушина Е.В.¹, Лысюк Е.Ю.^{2,3}, Посвятенко А.В.^{2,3,4},
Кибардин А.В.^{2,3}

¹ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Калужская область, Россия

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

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Нестабильность генома трансформированных клеток как одна из основных причин опухолевого роста может приводить к появлению в клетке ряда атипичных белков. Такие белки могут распознаваться иммунной системой и приводить к уничтожению измененных клеток. С другой стороны, фенотипическая нестабильность может влиять на появление трансформированных клеток, напрямую подавляющих эффекторное звено иммунного ответа и/или не распознаваемых цитотоксическими лимфоцитами. Одним из наиболее важных активирующих рецепторов, экспрессируемых НК-клетками, является рецептор NKG2D, необходимый для обнаружения и уничтожения трансформированных и инфицированных клеток. Лигандами для NKG2D являются поверхностные или свободно циркулирующие стресс-индуцируемые неканонические молекулы главного комплекса гистосовместимости I класса MICA/B (MHC class I chain-related proteins A and B). MICA и MICB отсутствуют или слабо экспрессируются в большинстве нормальных клеток. В то же время в опухолевых и инфицированных вирусами клетках их количество существенно повышено. Взаимодействие NKG2D со своими лигандами играет важную роль в регуляции противоопухолевых иммунных реакций. Так, накопление в крови растворимой формы MICA за счет протеолитического шеддинга с поверхности опухолевых клеток может блокировать NKG2D-опосредованную противоопухолевую цитотоксичность и, таким образом, способствовать ускользанию опухолевых клеток от иммунного надзора.

Цель настоящего исследования заключалась в оценке блокирующего эффекта растворимого рекомбинантного белка MICA человека (rhMICA) на рецептор НК-клеток NKG2D. Для этого выделенные из периферической крови мононуклеарные клетки обрабатывали различными концентрациями

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Е.В. Абакушина, Е.Ю. Лысюк, А.В. Посвятенко,
А.В. Кибардин «Ингибирование экспрессии активирующего
рецептора NKG2D на НК-клетках рекомбинантным
белком MICA» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19,
№ 1. С. 81–88. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-81-88

© Абакушина Е.В. и соавт., 2017

For citation:

E.V. Abakushina, E.Yu. Lyssuk, A.V. Posvyatenko, A.V. Kibardin
“Inhibition of the NKG2D activating receptor expression on cytotoxic
lymphocytes by recombinant MICA protein”, *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1,
pp. 81–88. doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-81-88

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-81-88>

(0, 1, 5 и 10 мкг/мл) растворимого рекомбинантного белка человека MICA, после чего клетки окрашивали антителами против CD314 (NKG2D) и проводили цитометрический анализ CD3⁺CD56⁺NK-клеток. Кроме того, аналогично анализировали активированные IL-2 и IL-15 лимфоциты больного меланомой. Показано, что кратковременная обработка лимфоцитов rhsMICA значительно снижает экспрессию рецептора NKG2D на цитотоксических лимфоцитах как у здоровых доноров, так и у больных меланомой, при этом изменения зависят от дозы rhsMICA. В то же время после активации цитокинами лимфоциты становятся, по всей видимости, более устойчивыми к ингибирующему воздействию rhsMICA, в результате чего значимого снижения экспрессии NKG2D на активированных NK-клетках не происходит. Данный факт дает предпосылки к использованию активированных NK-клеток для адоптивной иммунотерапии онкологических больных с MICA-позитивными опухолями.

Ключевые слова: NK-клетки, активирующий рецептор NKG2D, NKG2D лиганды, стресс-индуцированные молекулы MICA, ингибирование NKG2D

INHIBITION OF THE NKG2D ACTIVATING RECEPTOR EXPRESSION ON CYTOTOXIC LYMPHOCYTES BY RECOMBINANT MICA PROTEIN

Abakushina E.V.^a, Lyssuk E.Yu.^{b, c}, Posvyatenko A.V.^{b, c, d},
Kibardin A.V.^{b, c}

^a A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of the National Medical Research Radiological Centre, Obninsk, Kaluga Region, Russian Federation

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

^c Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

^d N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Genome instability of transformed cells, being the most common factor of malignancy, may result into production of abnormal proteins in these cells. Normally, the newly formed proteins are recognized by immune system, thus causing elimination of the transformed cells. Nevertheless, the phenotypic instability promotes formation of specific transformed cells which suppress effector immune reactions and/or are unrecognizable by cytotoxic lymphocytes.

NKG2D is one of the most important activating receptors expressed by NK cells. It serves as a major recognition receptor for detection and elimination of tumor and infected cells. The ligands for NKG2D include surface or circulating non-canonical MICA/B molecules from class I major histocompatibility complex (MHC class I chain-related proteins A and B). MICA and MICB are expressed scarcely, if at all, by the most normal cells, being, however, upregulated in cancer cells and virus-infected cells. NKG2D receptor-ligand interaction is important for regulation of anti-tumor immune reactions. The soluble form of MICA accumulated in blood due to proteolytic shedding from tumor cell membranes is able to inhibit the NKG2D mediated anti-tumor cytotoxicity and, therefore, promote the immune escape. The aim of our study was to estimate blocking effects of soluble recombinant human MICA protein (rhsMICA) upon NKG2D receptor of NK cells.

Mononuclear cells were isolated from peripheral blood, followed by incubation with of rhsMICA at different concentrations (0, 1, 5, or 10 µg/ml), staining with anti-CD314 (NKG2D) mAbs on the CD3⁺CD56⁺NK cells, and flow cytometry analysis. A similar treatment protocol was applied for IL2- and IL15-activated mononuclear cells isolated from the melanoma patients.

It has been shown that brief incubation of lymphocytes with rhsMICA caused a significantly reduced expression of NKG2D receptor on the surface of cytotoxic lymphocytes, both from healthy donors and melanoma patients. These changes depended on the MICA dose. Meanwhile, the cytokine-activated lymphocytes seem to become more resistant to inhibiting effects of rhsMICA, and, thus, do not cause any significant reduction of NKG2D expression on the activated NK cells. This fact may be a pre-requisite for usage of activated NK-cells for adoptive immunotherapy of cancer patients with MICA-positive malignancies.

Keywords: NK cells, NKG2D activating receptor, NKG2D ligands, stress-induced MICA, NKG2D inhibition

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-35-00105) и гранта Президента НШ-9069.2016.4.

Введение

В настоящее время эффект ускользания опухоли от иммунного надзора изучен не полностью [7], но некоторые механизмы этого феномена уже достаточно хорошо известны [6] и позволяют продолжать поиск эффективных и безопасных способов лечения онкологических заболеваний. Основной причиной опухолевого роста как стадийного процесса превращения нормальной соматической клетки в опухолевую является нестабильность генома трансформированных клеток [5]. В результате этого процесса в клетке обычно появляется ряд атипичных, измененных белковых молекул, которые теоретически могут распознаваться и уничтожаться иммунной системой. Одновременно с этим изменчивость фенотипа трансформированной клетки создает возможность для селекции вариантов клеток, которые не несут антигенных детерминант, распознаваемых лимфоцитами либо же подавляют эффекторное звено иммунного ответа [7]. Таким образом, генетическая нестабильность является одновременно причиной возникновения иммуногенности опухолей и причиной, по которой опухолевый рост чрезвычайно сложно контролировать как иммунологическими, так и любыми другими терапевтическими средствами. Достоверно показано, что иммунная система способна распознавать злокачественные клетки и реагировать на такое распознавание активацией и последующими каскадами иммунных реакций [14]. Одним из последствий активации сигнальных каскадов в опухолевой клетке является экспрессия на клеточной поверхности стресс-индуцированных молекул MICA и MICB, относящихся к семейству неканонических молекул гистосовместимости класса I (MHC class I-related molecules) [12]. Взаимодействие экспонированных на поверхности опухолевых клеток либо свободно циркулирующих в кровотоке молекул MICA с активирующим рецептором NK-клеток и цитотоксических Т-лимфоцитов NKG2D играет важную роль в регуляции противоопухолевых иммунных реакций [15]. Накопление растворимых форм лиганда MICA (sMICA) в сыворотке крови негативно сказывается на NKG2D-зависимой клеточной цито-

токсичности и может приводить к подавлению иммунного ответа [1, 8].

Рядом авторов было показано, что протеолитический шеддинг белка MICA с поверхности опухолевых клеток с образованием sMICA может приводить к анергии эффекторных клеток за счет уменьшения поверхностной экспрессии активирующего рецептора NKG2D, что определяет механизм уклонения опухолевых клеток от иммунного надзора [10, 13].

Некоторыми исследователями показано, что только 11,4% клеток-мишеней K562 экспрессируют стресс-индуцированные молекулы MICA, но успешно уничтожаются NK-клетками посредством контактного цитолиза [11]. Блокировка поверхностной экспрессии NKG2D приводит к ингибированию этого лиганд-рецепторного взаимодействия. В других экспериментальных статьях показано, что противоопухолевая активность NK-клеток не зависит от происхождения и типа роста клеток-мишеней, а определяется лишь наличием поверхностных маркеров на клетке-мишени [8]. Именно поэтому важно понимание механизма экспрессии и сбрасывания лигандов NKG2D, что приводит к активации или анергии эффекторов, а также является результатом взаимодействия растворимых форм MICA с активирующим рецептором NKG2D на поверхности цитотоксических лимфоцитов.

Целью исследования явилась оценка блокирующего эффекта растворимого рекомбинантного человеческого белка MICA (rhsMICA) на активирующий рецептор цитотоксических лимфоцитов человека NKG2D.

Материалы и методы

В работе использовали периферическую кровь 5 здоровых доноров старше 18 лет и больного меланомой. Объектом исследования служила периферическая венозная кровь, полученная путем пункции локтевой вены и собранная в вакуумные пробирки с добавлением КЗЭДТА. Мононуклеарные клетки выделяли по стандартной методике на градиенте плотности фикола (Ficoll-Paque™ Premium; density 1,077; GE Healthcare). Рекомбинантный белок rhsMICA (ЗАО «Протеинсинтез», Россия) разводили в концентрации 50 мкг/мл в фосфатном буферном растворе (ФСБ). Полученную после выделения мононуклеарной фракции клеточную суспензию разводили до концентрации $1-2 \times 10^6$ клеток/мл в ФСБ. В пробирки

вносили необходимое количество рекомбинантного белка для получения конечной концентрации 0 мкг/мл, 1 мкг/мл, 5 мкг/мл и 10 мкг/мл rhsMICA. Далее клетки инкубировали 30 мин при комнатной температуре и отмывали в ФСБ центрифугированием.

Для активации моноклеарные клетки помещали в 24-луночный планшет (Costar, США) в концентрации $1-2 \times 10^6$ клеток/мл по 1 мл в каждую лунку и на протяжении 4 дней культивировали в полной питательной среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) с добавлением IL-2 в концентрации 250 МЕ/мл (Ронколейкин, Биотех, Россия) и IL-15 (ImmunoTools, Германия) в концентрации 50 нг/мл. Культивирование проводилось в CO₂ инкубаторе во влажной атмосфере при 37 °C. Через 48 часов половину питательной среды заменяли новой [2, 3].

В работе оценивали субпопуляционный состав Т- и NK-лимфоцитов периферической крови и маркера активации NKG2D (CD314) на Т- и NK-клетках сразу после выделения и после активации на протяжении 4 дней. Для этого проводили цитофлуориметрический анализ с использованием меченых антител анти-CD56-FITC (eBioscience, США, clone MEM188), CD3-PC5.5 (Beckman Coulter IOTest® #PN A66327), CD314-PE (= NKG2D) (eBioscience, США, clone 1D11), CD25-FITC (ImmunoTools, Германия, #21810253sp), CD69-PE (ImmunoTools, Германия, #21620694 или Beckman Coulter IOTest, США, #PN IM1943U) и CD16-PC5 (Beckman Coulter IOTest, США, #A07767 100 t). Использовали соответствующие флуорохромам изотипические контроли анти-IgG1 (Beckman Coulter IOTest, США). Экспрессию CD314 анализировали на поверхности CD3-CD56⁺ лимфоцитов с помощью трехпараметрического цитометрического анализа CD314-PE/ CD56-FITC/ CD3-PC5.5 на проточном цитометре (Cytomics FC 500 MPL, Beckman Coulter).

Для цитометрического анализа клетки окрашивали в соответствии с рекомендациями фирм-производителей антител: к ресуспендированным в ФСБ моноклеарным клеткам добавляли требуемые количества антител в соответствии с протоколом исследования, инкубировали 30 мин при комнатной температуре и отмывали образцы в ФСБ, содержащем 1% ЭТС, путем центрифугирования при 350 g 10 мин. Супернатант отбирали,

а осадок в каждой пробирке разводили в 0,3 мл ФСБ.

Анализ проводили немедленно после окрашивания, анализировали не менее 5000 событий в секторе живых клеток. Обработку полученных результатов проводили с помощью программы CXP Analysis 2.2 (Beckman Coulter).

Статистический анализ данных проводили с помощью программ Microsoft Excel 2003 и Statsoft Statistica 6.0. Данные представляли как среднее по группе $\pm$ стандартное отклонение (SD). Для сравнения показателей использовали t-критерий Стьюдента. Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В данной работе проведен анализ влияния rhsMICA на поверхностную экспрессию рецептора NKG2D (CD314) на NK-клетках периферической крови здоровых людей и больных меланомой. В качестве источника rhsMICA использован человеческий рекомбинантный белок MICA в концентрациях 1, 5 и 10 мкг/мл.

Было проведено исследование по кратковременному блокированию рецептора NKG2D рекомбинантным белком MICA в течение 30 минут. В работе использовали моноклеарные клетки здоровых доноров сразу после выделения и активированные моноклеары больного меланомой на 4 день культивирования в присутствии IL-2 и IL-15. Показано, что NK-клетки (CD314⁺CD3⁻CD56⁺) больного меланомой экспрессируют NKG2D в 58,1%. После активации количество NKG2D⁺ NK-клеток увеличивается в 1,4 раза (рис. 1).

Было установлено, что кратковременная инкубация свежевыделенных лимфоцитов больного с различными концентрациями rhsMICA приводит к резкому снижению уровня поверхностной экспрессии CD314 на NK-клетках с 58,1 до 5,8% в зависимости от концентрации белка. При активации лимфоцитов больного меланомой поверхностная экспрессия NKG2D на NK-клетках возрастает до 84,3%. При кратковременной инкубации лимфоцитов с rhsMICA в различных концентрациях снижения экспрессии CD314 не произошло. Наоборот, прослеживается тенденция к незначительному увеличению NKG2D⁺ лимфоцитов среди субпопуляции NK-клеток (рис. 1).

Экспрессия NKG2D была выявлена на поверхности более 90% активированных NK-

клеток и существенно не изменялась при инкубировании с различными концентрациями рекомбинантного белка, несмотря на то, что использованный в эксперименте для обработки клеток максимальный уровень sMICA превышал таковой у онкологических больных в 10^3 - 10^4 раз. Возможно, это связано с тем, что нативные лимфоциты у больных меланомой более подвержены ингибирующему воздействию растворимых лигандов рецептора NKG2D. При активации лимфоциты изменяют свой потенциал и становятся более устойчивыми к негативному воздействию, вероятно, за счет предшествующего культивирования моноклеарных клеток в присутствии IL-2 и IL-15 на протяжении 4 дней. Возможно, что в этом случае интерлейкины могут выступать в качестве источников дополнительных сигналов активации. Данный факт свидетельствует в пользу того, что у активированных лимфоцитов максимально увеличивается экспрессия CD314. За счет этого они обладают повышенной функциональной активностью и могут быть использованы для адоптивной иммунотерапии даже у больных при наличии высоких концентраций растворимых форм молекул MICA в периферической крови.

Также в работе было продемонстрировано, что присутствие растворимой формы молекулы rhsMICA приводит к увеличению доли NK-клеток в субпопуляции моноклеаров и повышению экспрессии на их поверхности маркеров ранней (CD69) и более поздней активации (CD25) (рис. 2). Так, обработка клеток высокими концентрациями белка rhsMICA в течение 30 минут приводила к достоверному увеличению данных показателей на лимфоцитах по сравнению с необработанными лимфоцитами.

Таким образом, показано, что обработка лимфоцитов рекомбинантным MICA значительно снижает экспрессию рецептора NKG2D только у не активированных NK-клеток как больных меланомой, так и здоровых доноров, что подтверждает полученные нами ранее данные в системе растворимого белка sMICA, получаемого из супернатанта клеточной линии В-лимфомы человека C1R-MICA и хорошо согласуется с литературными данными [8, 9]. Как было показано ранее, суточная инкубация эффекторов в присутствии супернатанта, содержащего sMICA, приводит к снижению экспрессии NKG2D и ингибированию их способности лизировать клетки-мишени линии K562. С другой стороны, кратко-

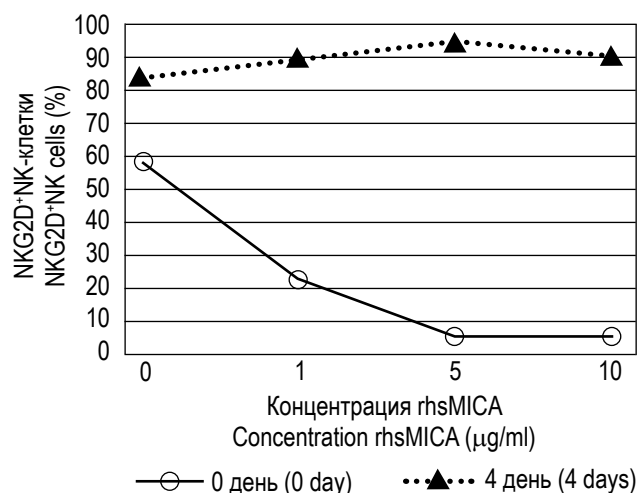


Рисунок 1. Ингибирование экспрессии рецептора NKG2D с помощью рекомбинантного человеческого белка MICA (rhsMICA) на поверхности NK-клеток больной меланомой сразу после выделения моноклеарных клеток (0 день) и на 4 день после активации

Figure 1. Inhibition of NKG2D receptor expression on the surface of NK cells from melanoma patient by means of recombinant human protein MICA (rhsMICA) observed with freshly isolated mononuclear cells (day 0, circles), and on day 4 after activation (triangles).

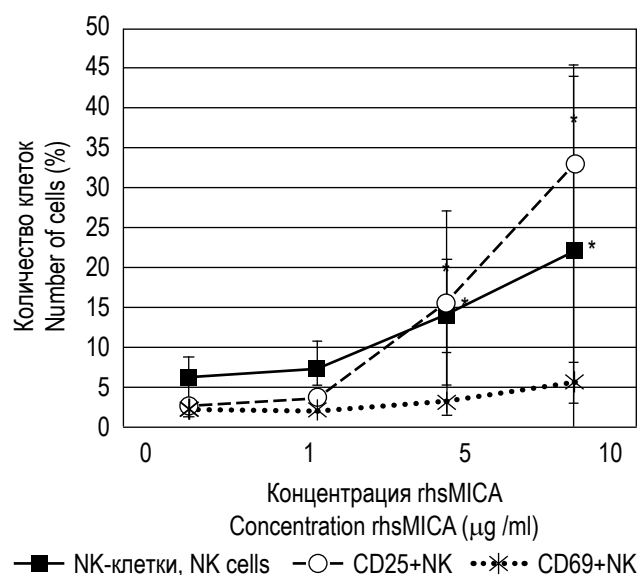


Рисунок 2. Изменение экспрессии рецепторов NK-клеток и маркеров активации CD25 и CD69 на поверхности NK-клеток здоровых доноров сразу после выделения ПМН и инкубации в присутствии различных концентраций рекомбинантного человеческого белка MICA (rhsMICA)
Примечание. * – достоверно значимые отличия количества клеток в зависимости от концентрации rhsMICA ($p < 0.05$)

Figure 2. Changes in expression of surface NK cells receptors and activation markers (CD25 and CD69) of healthy donors observed with freshly isolated mononuclear cells, and following incubation with recombinant human protein MICA (rhsMICA) at different concentrations.

Note. * – significant differences in cell numbers, dependent of rhsMICA concentrations ($p < 0.05$).

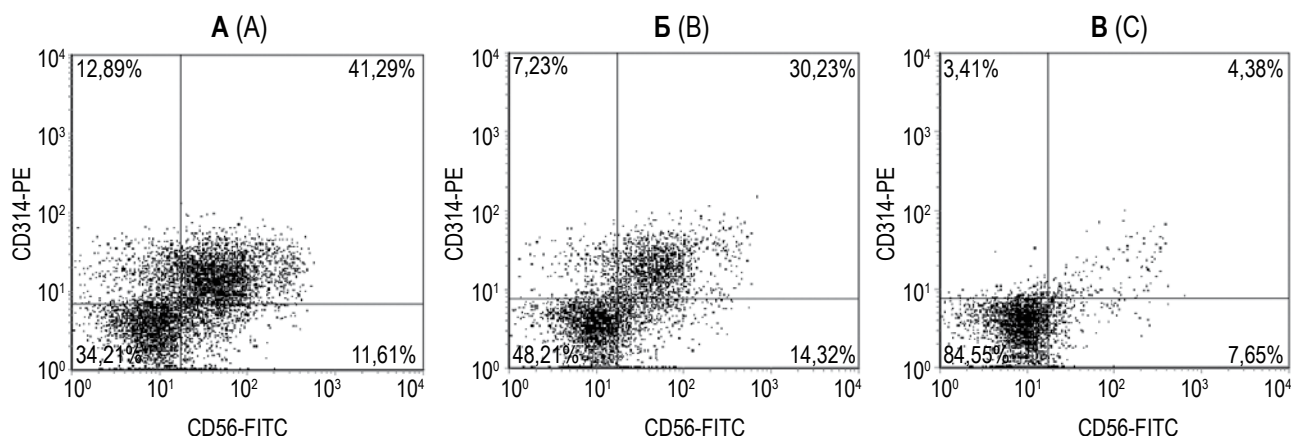


Рисунок 3. Ингибирование NKG2D высокими концентрациями rhsMICA на CD3⁺CD56⁺ лимфоцитах здорового донора (типичный пример)

Примечание. Без обработки rhsMICA (А), обработка мононуклеаров rhsMICA в концентрации 1 мкг/мл (Б) и 5 мкг/мл (В).

Figure 3. NKG2D inhibition on CD3⁺CD56⁺ lymphocytes of a healthy donor at high rhsMICA concentrations (typical pattern).

Note. A – without rhsMICA treatment; B – incubation with rhsMICA (1 µg/ml); C – with rhsMICA (5 µg/ml).

срочная инкубация мононуклеарных клеток здоровых доноров увеличивает поверхностную экспрессию маркеров активации, что отражает их способность к увеличению функциональной активности. Результаты данной работы подтверждают полученные ранее данные об увеличении количества НК-клеток и повышении экспрессии маркеров активации в группе больных раком желудка, кишечника и меланомой с высоким уровнем сывороточного sMICA [1, 2, 3, 4].

В данной экспериментальной системе у здоровых добровольцев продемонстрировано ингибирующее действие высоких концентраций rhsMICA на экспрессию NKG2D (рис. 3). Показано, что после активации в присутствии IL-2 и IL-15 цитотоксические лимфоциты обладают повышенной экспрессией CD314, которая не ингибируется в полной мере, несмотря на присутствие rhsMICA. Таким образом, активация лимфоцитов *in vitro* может являться одним из подходов к иммунотерапии опухолей.

Полученные экспериментальные данные указывают на наличие опосредованных NKG2D механизмов регуляции функций естественных киллеров при взаимодействии с клетками-мишенями, экспрессирующими лиганды NKG2D

и растворимыми формами этих молекул как у здоровых доноров, так и у онкологических больных.

Заключение

В системе *in vitro* продемонстрировано rhsMICA-зависимое угнетение экспрессии активирующего рецептора NKG2D на НК-клетках здоровых людей и больных меланомой. После активации мононуклеарных клеток *in vitro* экспрессия NKG2D возрастает, что подтверждает полученные нами ранее данные на большем количестве онкологических больных [2, 3].

Таким образом, в экспериментальной модели нами показано, что резкое повышение уровня sMICA в культуральной среде приводит к снижению уровня экспрессии одного из основных активирующих рецепторов цитотоксических лимфоцитов, NKG2D, что предполагает участие сывороточных молекул sMICA в супрессии противоопухолевого иммунного ответа. Полученные данные необходимо учитывать при разработке подходов к адоптивной иммунотерапии активированными НК-клетками онкологических больных с MICA-позитивными опухолями или высоким титром MICA в периферической крови.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Неприна Г.С., Пасова И.А., Бердов Б.А., Клинова А.В., Коваленко Е.И., Каприн А.Д. Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул MICA в сы-

воротке крови больных раком желудка и толстой кишки // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 63-67. [Abakushina E.V., Abakushin D.N., Neprina G.S., Pasova I.A., Berdov B.A., Klinkova A.V., Kovalenko E.I., Kaprin A.D. Elevation of serum levels of cytokines and stress-induced molecules MICA in patients with gaster and colon cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1. pp. 63-67. (In Russ.)]

2. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Каприн А.Д. Морфо-функциональная характеристика лимфоцитов человека после активации *in vitro* // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2016. Т. 161, № 5. С. 678-683. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Kaprin A.D. The morpho-functional characteristic of human lymphocytes after activation *in vitro*. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2016, no. 5, pp. 678-683. (In Russ.)]

3. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С. Эффективность совместного применения IL-2 и IL-15 для активации цитотоксических лимфоцитов *in vitro* // Гены и клетки, 2015. Т. 10, № 2. С. 78-85. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S. Efficiency of IL-2 and IL-15 combined use for activation of cytotoxic lymphocytes *in vitro*. *Geny i kletki = Gene and Cells*, 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 78-85. (In Russ.)]

4. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Неприна Г.С., Кудрявцев Д.В., Кудрявцева Г.Т., Селиванова Н.В. Фенотип лимфоцитов у больных меланомой кожи после иммунотерапии активированными лимфоцитами // Медицинская иммунология, 2014. Т. 16, № 6. С. 567-576. [Abakushina E.V., Marizina Yu.V., Neprina G.S., Kudryavtsev D.V., Kudryavtseva G.T., Selivanova N.V. Lymphocyte phenotype in patients with skin melanoma after immunotherapy of activated lymphocytes. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2014, Vol. 16, no. 6, pp. 567-576. (In Russ.)] DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2014-6-567-576>

5. Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Козлов А.М., Ларин С.С. Молекулярные механизмы взаимодействия опухоли и иммунной системы // Вопросы онкологии, 2008. Т. 54, № 6. С. 669-683. [Berezhnoy A.E., Gnouchiev N.V., Georgiev G.P., Kozlov A.M., Larin S.S. Molecular mechanisms of interaction between the tumor and the immune system. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2008, Vol. 54, no. 6, pp. 669-683. (In Russ.)]

6. Бережной А.Е., Чернышева А.Д., Закеева И.Р., Данилова А.Б., Данилов А.О., Моисеенко В.М., Geraghty D., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Кибардин А.В., Ларин С.С. Индукция экспрессии молекулы HLA-E на поверхности опухолевых клеток интерфероном-гамма приводит к защите опухолевых клеток от цитотоксического действия лимфоцитов // Вопросы онкологии, 2009. Т. 55, № 2. С. 224-229. [Berezhnoy A.E., Chernysheva A.D., Zakeeva I.R., Danilova A.B., Danilov A.O., Moiseyenko V.M., Geraghty D., Gnouchiev N.V., Georgiyev G.P., Kibardin A.V., Larin S.S. HLA-E molecule induction on the surface of tumor cells protects them from cytotoxic lymphocytes. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2009, Vol. 55, no. 2, pp. 224-229. (In Russ.)]

7. Закеева И.Р., Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Ингибиторные рецепторы лимфоцитов и их роль в противоопухолевом иммунитете // Вопросы онкологии, 2007. Т. 53, № 2. С. 140-149. [Zakeeva I.R., Berezhnoy A.E., Gnouchiev N.V., Georgiyev G.P., Larin S.S. Inhibitory receptors of lymphocytes and their role in antitumor immunity. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2007, Vol. 53, no. 2, pp. 140-149. (In Russ.)]

8. Bae D.S., Hwang Y.K., Lee J.K. Importance of NKG2D NKG2D ligands interaction for cytolytic activity of natural killer cell. *Cellular Immunology*, 2012, Vol. 276, pp. 122-127.

9. Doubrovina E.S., Doubrovin M.M., Vider E., Sisson R.B., O'Reilly R.J., Dupont B., Vyas Y.M. Evasion from NK cell immunity by MHC class I chain-related molecules expressing colon adenocarcinoma. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 12, pp. 6891-6899.

10. El-Gazzar A., Groh V., Spies T. Immunobiology and conflicting roles of the human NKG2D lymphocyte receptor and its ligands in cancer. *Immunology*, 2013, Vol. 191, pp. 1509-1515.

11. Fernandez L., Portugal R., Valentin J., Martín R., Maxwell H., González-Vicent M., Ángel Díaz M., de Prada I., Pérez-Martínez A. *In vitro* natural killer cell immunotherapy for medulloblastoma. *Frontiers in Oncology*, 2013, Vol. 3, Art. 94.

12. Groh V., Wu J., Yee C., Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 2002, Vol. 419, pp. 734-738.
13. Krieg S., Ullrich E. Novel immune modulators used in hematology: impact on NK cells. *Front. Immunol.*, 2013, Vol. 3, Art. 388.
14. Martin G.S. Cell signaling and cancer. *Cancer Cell.*, 2003, Vol. 4, pp. 167-174.
15. Pardoll D. Immunology. Stress, NK Receptors, and Immune Surveillance. *Science*, 2001, Vol. 294, pp. 534-538.

Авторы:

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

Лысюк Е.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной терапии ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Посвятенко А.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории генной терапии ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Научно-исследовательского института трансляционной медицины ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кибардин А.В. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной терапии ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

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

Lyssuk E. Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Posvyatenko A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, N. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Kibardin A.V., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation

Поступила 19.10.2016
Принята к печати 20.10.2016

Received 19.10.2016
Accepted 20.10.2016

РОЛЬ Treg-КЛЕТОК В АДЕНОЗИН-ОПОСРЕДОВАННОЙ ИММУННОЙ СУПРЕССИИ ПРИ КОЛОРЕКТАЛЬНОМ РАКЕ

Жулай Г.А.¹, Олейник Е.К.¹, Чуров А.В.¹, Романов А.А.²,
Кравченко (Семакова) П.Н.¹, Олейник В.М.¹

¹ ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

² ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Россия

Резюме. В настоящее время активно исследуется иммуносупрессорная роль внеклеточного аденозина при канцерогенезе. Колоректальный рак является одним из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований в России и в мире, однако роль участников (CD39, CD73, A2AR) аденозин-опосредованной иммуносупрессии у больных колоректальным раком пока не ясна. В работе исследовали уровень мРНК генов A2AR, эктонуклеотидаз CD39 и CD73 (гидролизующих АТФ до аденозина) в лейкоцитах больных колоректальным раком. Показано, что у больных содержание мРНК CD39 увеличивается в процессе развития заболевания, тогда как для CD73 значительных различий по сравнению со здоровыми донорами не было. У больных с поздними стадиями колоректального рака отмечено повышение экспрессии мРНК A2AR, что может свидетельствовать об активации аденозин-A2AR иммуносупрессорного механизма. Кроме того, при развитии колоректального рака усиливается экспрессия молекулы CD39 на Т-клетках. Наиболее значительное изменение экспрессии CD39 как на Т-хелперах, так и на Тreg-клетках отмечено на поздних стадиях колоректального рака. Также обнаружена прямая корреляция между экспрессией эктонуклеотидазы CD39 на CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-} Treg-клетках и изменением уровня мРНК A2AR лейкоцитов онкологических больных.

Ключевые слова: Treg-клетки, эктонуклеотидаза CD39, A2AR, колоректальный рак

SIGNIFICANCE OF Treg CELLS FOR ADENOSINE-MEDIATED IMMUNE SUPPRESSION IN COLORECTAL CANCER

Zhulai G.A.^a, Oleinik E.K.^a, Churov A.V.^a, Romanov A.A.^b,
Kravchenko (Semakova) P.N.^a, Oleinik V.M.^a

^a Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

^b Republican Cancer Dispensary, Petrozavodsk, Russian Federation

Abstract. At the present time, immunosuppressive role of extracellular adenosine in carcinogenesis is actively investigated. Colorectal cancer is one of the most common types of malignant neoplasms in Russia

Адрес для переписки:

Жулай Галина Анатольевна
ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН
185014, Россия, Республика Карелия, г. Петрозаводск,
ул. Пушкинская, 11.
Тел.: 8 (953) 525-26-36.
Факс: 8 (8142) 76-98-10.
E-mail: zhgali-111@yandex.ru

Address for correspondence:

Zhulai Galina A.
Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences
185910, Russian Federation, Karelia, Petrozavodsk,
Pushkinskaya str., 11.
Phone: 7 (953) 525-26-36.
Fax: 7 (8142) 76-98-10.
E-mail: zhgali-111@yandex.ru

Образец цитирования:

Г.А. Жулай, Е.К. Олейник, А.В. Чуров, А.А. Романов, П.Н. Кравченко (Семакова), В.М. Олейник «Роль Treg-клеток в аденозин-опосредованной иммунной супрессии при колоректальном раке» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 89-94.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-89-94

© Жулай Г.А. и соавт., 2017

For citation:

G.A. Zhulai, E.K. Oleinik, A.V. Churov, A.A. Romanov, P.N. Kravchenko (Semakova), V.M. Oleinik "Significance of Treg cells for adenosine-mediated immune suppression in colorectal cancer", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 89-94.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-89-94

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-89-94>

and worldwide, but the role of mediators of adenosine-dependent immunosuppression, such as CD39 (that hydrolyze ATP to adenosine), CD73, A2AR, is not yet clear in patients with colorectal cancer. The levels of specific mRNAs for A2AR, ectonucleotidase CD39, and CD73 genes were assayed in white blood cells of the patients with colorectal cancer. The results have shown that the CD39 mRNA content is increased in the patients with colorectal cancer in the course of the disease progression. Meanwhile, no significant difference for CD73 gene expression was found between the patients and healthy donors. Moreover, an increase in A2AR mRNA expression was noted for the patients with advanced colorectal cancer, thus presuming potential activation of adenosine-A2AR-mediated immunosuppressive mechanism. Furthermore, the CD39 expression on T cells was elevated in parallel to the cancer progression. The most significant changes in CD39 expression were observed for both T helper and Treg cell populations at the late stages of colorectal cancer. Similarly, a direct correlation was revealed between CD39 expression on CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg cells, and changes of A2AR mRNA levels in leukocytes from the cancer patients.

Keywords: Treg cells, CD39 ectonucleotidase, A2AR, colorectal cancer

Работа выполнена при поддержке РФФИ, проект № 16-34-00970, и бюджетной темы № 0221-2014-0011.

Введение

Колоректальный рак (КРР) является одним из наиболее распространенных типов злокачественных новообразований в России и в мире [2]. Известно, что при КРР особую важность составляет инфильтрация опухоли клетками иммунной системы [8]. Однако в процессе развития опухолевые клетки, используя различные механизмы, могут вызывать супрессию противоопухолевого иммунного ответа. Относительно недавно была показана важная роль внеклеточного аденозина при канцерогенезе [9]. Аденозин может усиливать неоангиогенез, стимулируя пролиферацию эндотелиальных клеток и экспрессию фактора роста эндотелия сосудов. Кроме того, он обладает иммуносупрессорным действием. Накопление аденозина приводит к ингибированию эффекторных функций Т-клеток, включая пролиферацию, экспансию и секрецию важных противоопухолевых цитокинов, таких как IFN γ и TNF α [9]. Образование внеклеточного аденозина происходит путем гидролиза нуклеотидов АТФ и АДФ до АМФ эктонуклеозид трифосфат дифосфогидролазой-1 (ENTPD1, CD39), и далее до самого нуклеозида экто-5'-нуклеотидазой (NT5E, CD73). CD39 и CD73 экспрессируются многими лейкоцитами, а именно Т- и В-лимфоцитами, нейтрофилами, натуральными киллерами, моноцитами и макрофагами [3]. Противовоспалительное действие внеклеточного аденозина на Т-клетки реализуется при активации аденозинового рецептора A2A (A2AR), что в свою очередь вызывает накопление в клетке иммуносупрессорного цАМФ [4, 9]. В связи с этим блокирование сигнального пути внеклеточный аденозин-A2AR в настоящее время

рассматривается в качестве терапевтического подхода для усиления эффективности опухолевых специфических CD8⁺ и CD4⁺Т-клеток [4].

Среди лимфоцитов есть популяция регуляторных Т-клеток (Treg), в культуре которых было продемонстрировано непосредственное накопление аденозина [6]. Показано, что у человека Treg-клетки экспрессируют только CD39, в отличие от мышинных, способных экспрессировать обе эктонуклеотидазы CD39 и CD73. Treg-клетки отличаются экспрессией транскрипционного фактора FoxP3, высокой конститутивной экспрессией α -цепи рецептора к IL-2 (CD25), а также низкой экспрессией молекулы CD127 (IL-7R α). Эти лимфоциты присутствуют в большом количестве в опухолевой ткани и крови онкологических больных и препятствуют эффективному противоопухолевому иммунному ответу благодаря широкому набору ингибиторных механизмов, к одному из которых относят участие в генерации внеклеточного аденозина.

В настоящее время участники аденозин-опосредованной иммуносупрессии (CD39, CD73, A2AR) изучаются на различных моделях опухолей, однако их роль у больных КРР пока не ясна. Целью исследования было изучение влияния развития КРР на изменение уровня экспрессии лейкоцитами мРНК генов CD39, CD73, A2AR и на экспрессию эктонуклеотидазы CD39 Treg-клетками.

Материалы и методы

В работе исследовано 42 образца периферической крови больных КРР, средний возраст которых составил 65,0 $\pm$ 12,4 лет и 30 образцов крови здоровых доноров (контроль) в возрасте 54,4 $\pm$ 20,6 лет. Экспрессию мРНК CD39, CD73, A2AR определяли методом ПЦР в реальном времени. Выделение и очистку нуклеиновых кис-

лот проводили с помощью набора «AxyPrep Blood Total RNA Miniprep Kit» (Axygen, США). Для синтеза кДНК использовали случайные гексапраймеры и MMLV-обратную транскриптазу (ООО «Силекс», Россия). Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени выполняли с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I (ЗАО «Евроген», Россия) на приборе iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad, США). Экспрессию молекул клетками оценивали методом многоцветной проточной цитометрии на приборе Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США) с использованием моноклональных антител CD4-FITC, CD25-PC5, CD127-PC7 (Beckman Coulter, Франция), CD39-PE (R&D Systems, США), FoxP3-PE (eBioscience, США) и соответствующих изотипических контролей. Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ Statistica 6.0, достоверность различий между группами рассчитывали по критерию Манна–Уитни при уровне значимости $p < 0,05$. Для выявления и оценки характера связи между признаками использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Данные представлены в виде $M \pm SD$. Исследо-

вание выполнено с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН (ЦКП НО ИБ КарНЦ РАН).

Результаты и обсуждение

Обследованные больные KPP были разделены на две группы: ранние стадии заболевания – больные на I–II стадиях развития KPP и поздние стадии заболевания – больные на III–IV стадиях. Определение уровня генов эктонуклеотидаз CD39 и CD73 в периферических лейкоцитах больных KPP показало, что наиболее значительные изменения происходят в экспрессии CD39, причем содержание мРНК CD39 увеличивается в процессе развития заболевания (рис. 1). Для CD73 достоверных различий с контролем не наблюдалось.

У больных с поздними стадиями KPP отмечено также значительное повышение экспрессии мРНК A2AR (рис. 1), что, вероятно, свидетельствует об активации аденозин-A2AR иммуносупрессорного сигнального пути.

Для оценки роли Treg-клеток в этом механизме исследовали экспрессию молекулы CD39 CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-

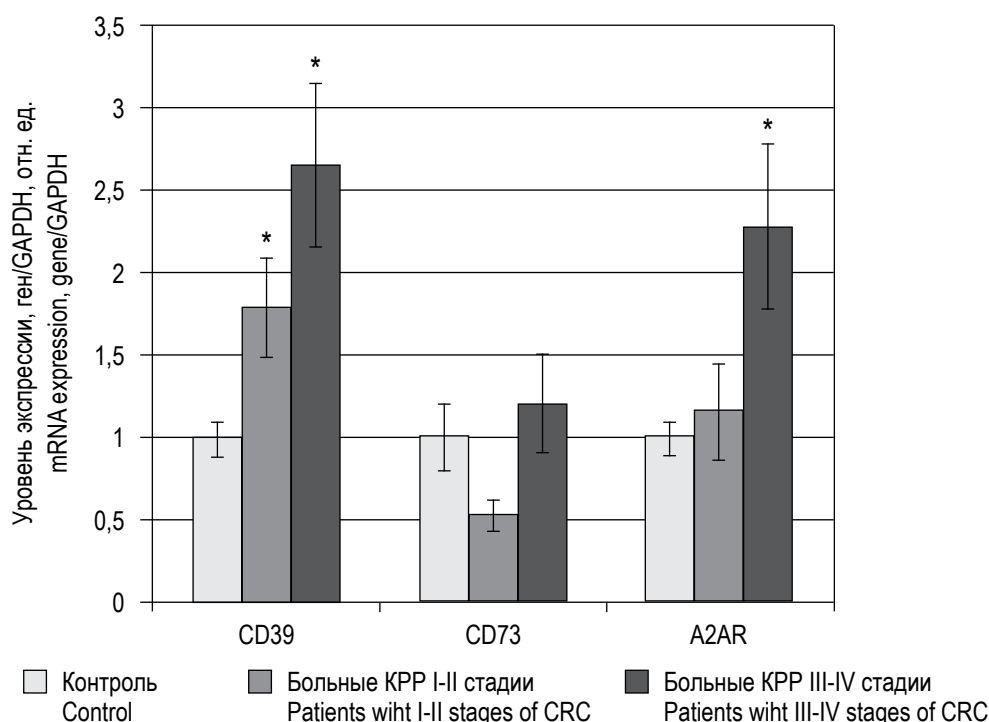


Рисунок 1. Относительный уровень мРНК CD39, CD73 и A2AR в лейкоцитах периферической крови больных на разных стадиях KPP, нормализованный по мРНК GAPDH

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с контролем, данные представлены как $M \pm SE$.

Figure 1. Relative mRNA levels of CD39, CD73 and A2AR in peripheral blood leukocytes of patients at different stages of CRC normalized for GAPDH mRNA

Note. * – difference from the controls is statistically significant; the data are presented as $M \pm SE$.

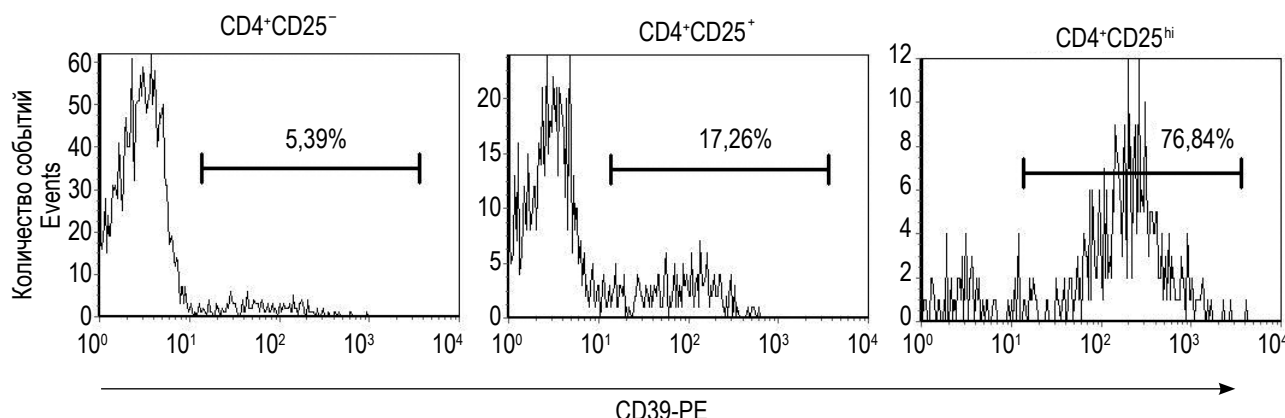


Рисунок 2. Распределение экспрессии CD39 в зависимости от экспрессии CD25 на поверхности CD4⁺Т-клеток у больного КРР

Примечание. Справа под горизонтальной линией отмечены клетки, экспрессирующие CD39, слева находятся клетки, негативные по экспрессии CD39.

Figure 2. Distribution of CD39 expression for CD4⁺CD25⁻, CD4⁺CD25⁺ and CD4⁺CD25^{hi} T cells in CRC patients
Note. CD39-expressing cells are noted below the horizontal line (right), whereas CD39neg cells are located on the left.

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ МОЛЕКУЛЫ CD39 CD4⁺Т-КЛЕТКАМИ ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ И БОЛЬНЫХ КРР

TABLE 1. CD39 EXPRESSION BY CD4⁺T CELLS IN HEALTHY DONORS AND CRC PATIENTS, M±SD

	CD39/CD4 ⁺ CD25 ⁺	CD39/CD4 ⁺ CD25 ^{hi}	CD39/CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-}
Контроль, n = 30 Healthy donors (controls)	9,66±0,8%	39,66±2,5%	41,16±3,1%
больные КРР I-II стадии, n = 20 Patients with I-II stage CRC	13,17±1,9%	53,97±4,0%*	55,24±4,2%*
больные КРР III-IV стадии, n = 22 Patients with III-IV stage CRC	16,15±1,7%*	66,04±3,5%**	67,95±3,1%**

Примечание. * – различия достоверны по сравнению с контролем; * – различия достоверны по сравнению с группой больных на I-II стадиях развития КРР.

Note. * – difference from the control is statistically significant; * – difference from the group with I-II stage CRC is statistically significant.

клетками. Оказалось, что Treg-клетки экспрессируют эту эктонуклеотидазу сильнее, чем клетки с фенотипом, не характерным для регуляторных лимфоцитов CD4⁺CD25⁻ и CD4⁺CD25⁺ (рис. 2, табл. 1). Так, у здоровых доноров для клеток с фенотипом CD4⁺CD25⁻ уровень экспрессии CD39 составил 5,58±3,9% от CD4⁺Т-клеток, что значительно отличается от уровня экспрессии этой молекулы CD4⁺CD25^{hi} (p < 0,001) и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клетками (p < 0,001; табл. 1). В литературе отмечается, что экспрессия CD39 может увеличиваться после активации Т-лимфоцитов [3], но этот уровень экспрессии все равно был выше для Treg-клеток по сравнению с активированными CD4⁺CD25⁺Т-клетками (p < 0,001; табл. 1). У больных лиц наблюдалась такая же закономерность.

Имеются сведения [10], что молекулу CD39 могут секретировать как FoxP3⁺, так и FoxP3⁻

CD4⁺Т-клетки. Но только FoxP3⁺CD39⁺Treg-клетки могут подавлять иммунный ответ, в то время как FoxP3⁻CD39⁺Т-клетки схожи по характеристикам с клетками памяти и не проявляют супрессии [10]. В наших опытах, как у здоровых, так и у больных CD4⁺CD25⁺Т-клетки слабо экспрессировали транскрипционный фактор FoxP3. Так, у больных КРР уровень экспрессии FoxP3 для CD4⁺CD25⁺ клеток составил 15,20±8,5%, тогда как у CD4⁺CD25^{hi}Treg-клеток уровень экспрессии FoxP3 был 67,49±14,7% (p < 0,001). Кроме того, нами обнаружена положительная корреляция между экспрессией CD39 и экспрессией транскрипционного фактора FoxP3 на CD4⁺Т-клетках: у больных КРР коэффициент корреляции был равен 0,47 при p = 0,006. Эти результаты, а также данные других авторов [6, 7] свидетельствуют о том, что экспрессия CD39 в большей

степени характерна для Treg-клеток по сравнению с другими популяциями Т-лимфоцитов.

Содержание CD4⁺T-клеток, экспрессирующих эктонуклеотидазу CD39, в крови обследованных лиц сильно колеблется. Так, у здоровых доноров количество этих клеток составляло в среднем 7,29±3,5% от CD4⁺T-клеток и варьировало от 1,46 до 13,61%, а у больных КРР — 10,7±4,9% (от 2,16 до 21,53%); различия между этими группами были достоверны ($p < 0,05$). При анализе количества CD4⁺CD39⁺T-клеток у больных КРР в зависимости от развития заболевания обнаружилось, что накопление этих клеток происходит на более поздних стадиях КРР (группа больных с III-IV стадиями) по сравнению контролем ($p < 0,01$).

Усиление уровня экспрессии молекулы CD39 наблюдали у CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клеток больных КРР (табл. 1). Экспрессия эктонуклеотидазы Treg-клетками увеличивается уже на начальных стадиях развития опухоли и достигает максимальных значений у больных с III-IV стадиями КРР.

Кроме того, отмечена повышенная экспрессия молекулы CD39 активированными CD4⁺CD25⁺T-хелперами у больных с III-IV стадиями развития опухоли (табл. 1) по сравнению с контролем ($p < 0,05$). Таким образом, накопление CD4⁺CD39⁺T-клеток у больных на поздних стадиях КРР происходит не только за счет экспрессии этой эктонуклеотидазы Treg-клетками, но и активированными Т-хелперами.

Мы оценили роль Treg-клеток в активации аденозин-опосредованной супрессии иммунного

ответа у больных КРР. Для этого была проанализирована связь экспрессии CD39 этой популяцией клеток с изменением относительного содержания мРНК клеточного рецептора A2A. Оказалось, что существует положительная корреляция между уровнем экспрессии этого гена и уровнем экспрессией молекулы CD39 на CD4⁺CD25^{hi} и CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клетках. Так, для CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клеток r был 0,45 ($p = 0,039$). В то же время существенной корреляции экспрессии CD39 на CD4⁺CD25⁺ активированных Т-клетках с содержанием мРНК A2AR не обнаружено.

Таким образом, согласно полученным данным по изучению уровня мРНК CD39 и экспрессии этой нуклеотидазы CD4⁺T-клетками, периферические лимфоциты больных КРР активно участвуют в расщеплении АТФ до АМФ и тем самым способствуют генерации аденозина и активации аденозин-опосредованной супрессии. Можно предположить, что ослабление клеточного иммунитета у больных КРР [1] связано с этим механизмом развития иммунной супрессии. Положительная корреляция между уровнем экспрессии CD39 CD4⁺CD25⁺CD127^{lo/-}Treg-клетками и изменением относительного содержания мРНК рецептора A2A в лейкоцитах, возможно, свидетельствует о значительном вкладе Treg в активацию аденозин-A2AR супрессии. Изменения в содержании мРНК A2AR могут представлять интерес как один из важных критериев оценки уровня иммунной супрессии при КРР.

Список литературы / References

1. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Романов А.А., Олейник В.М., Чуров А.В., Кравченко П.Н. Циркулирующие регуляторные Т-клетки и изменения в субпопуляционном составе лимфоцитов у больных колоректальным раком // Вопросы онкологии, 2016. Т. 62, № 1. С. 96-100. [Zhulai G.A., Oleinik E.K., Romanov A.A., Oleinik V.M., Churov A.V., Kravchenko P.N. Circulating regulatory T-cells and changes in the subpopulation composition of lymphocytes in colorectal cancer patients. *Voprosy onkologii = Problems in Oncology*, 2016, Vol. 62, no. 1, pp. 96-100. (In Russ.)]
2. Циммерман Я.С. Колоректальный рак: современное состояние проблемы // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, 2012. Т. 22, № 4. С. 5-17. [Tsimmerman Ya.S. Colorectal cancer: state-of-the-art. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, kolopraktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*, 2012, Vol. 22, no. 4, pp. 5-17. (In Russ.)]
3. Antonioli L., Pacher P., Vizi S.E., Haskó G. CD39 and CD73 in immunity and inflammation. *Trends Mol. Med.*, 2013, Vol. 19, pp. 355-367.
4. Haskó G., Linden J., Cronstein B., Pacher P. Adenosine receptors: therapeutic aspects for inflammatory and immune diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.*, 2008, Vol. 7, no. 9, pp. 759-770.
5. Longhi M.S., Robson S.C., Bernstein S.H., Serra S., Deaglio S. Biological functions of ecto-enzymes in regulating extracellular adenosine levels in neoplastic and inflammatory disease states. *J. Mol. Med. (Berl)*, 2013, Vol. 91, pp. 165-172.
6. Mandapathil M., Hilldorfer B., Szczepanski M.J., Czystowska M., Szajnik M., Ren J., Lang S., Jackson E.K., Gorelik E., Whiteside T.L. Generation and accumulation of immunosuppressive adenosine by human CD4⁺CD25^{high}FOXP3⁺ regulatory T cells. *Journal of Biological Chemistry*, 2010, Vol. 285, pp. 7176-7186.

7. Mandapathil M., Szczepanski M.J., Szajnik M., Ren J., Lenzner D.E., Jackson E.K., Gorelik E., Lang S., Johnson J.T., Whiteside T.L. Increased ectonucleotidase expression and activity in regulatory T cells of patients with head and neck cancer. *Clin. Cancer Res.*, 2009, Vol. 15, pp. 6348-6357.
8. Nosh K., Baba Y., Tanaka N., Shima K., Hayashi M., Meyerhardt J.A., Giovannucci E., Dranoff G., Fuchs C.S., Ogino S. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *J. Pathol.*, 2010, Vol. 222, pp. 4350-4366.
9. Ohta A., Gorelik E., Prasad S.J., Ronchese F., Lukashev D., Wong M.K., Huang X., Caldwell S., Liu K., Smith P., Chen J.F., Jackson E.K., Apasov S., Abrams S., Sitkovsky M. A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2006, Vol. 103, pp. 13132-13137.
10. Zhou Q., Yan J., Putheti P., Wu Y., Sun X., Toxavidis V., Tigges J., Kassam N., Enjyoji K., Robson S.C., Strom T.B., Gao W. Isolated CD39 expression on CD4⁺ T cells denotes both regulatory and memory populations. *Am. J. Transplant.*, 2009, Vol. 9, pp. 2303-2311.

Авторы:

Жулай Г.А. — младший научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Олейник Е.К. — д.б.н., главный научный сотрудник, заведующая группой иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Чуров А.В. — к.б.н., научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Романов А.А. — врач хирург-онколог ГБУЗ «Республиканский онкологический диспансер», г. Петрозаводск, Россия

Кравченко (Семакова) П.Н. — младший научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Олейник В.М. — д.б.н., ведущий научный сотрудник группы иммунологии ФГБУН «Институт биологии Карельского научного центра» РАН, г. Петрозаводск, Россия

Authors:

Zhulai G.A., Junior Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Oleinik E.K., PhD, MD (Biology), Chief Research Associate, Head, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Churov A.V., PhD (Biology), Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Romanov A.A., Oncology Surgeon, Republican Cancer Dispensary, Petrozavodsk, Russian Federation

Kravchenko (Semakova) P.N., Junior Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Oleinik V.M., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Immunology Group, Institute of Biology of Karelian Research Centre, Russian Academy of Sciences, Petrozavodsk, Russian Federation

Поступила 20.10.2016
Принята к печати 31.10.2016

Received 20.10.2016
Accepted 31.10.2016

СЕМЕЙНЫЙ СЛУЧАЙ СИНДРОМА ДИ ДЖОРДЖИ (СИНДРОМА ДЕЛЕЦИИ 22q11.2)

Тузанкина И.А.^{1,2,3}, Дерябина С.С.^{1,2}, Власова Е.В.^{2,3}, Болков М.А.^{1,2}

¹ ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина»,
г. Екатеринбург, Россия

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

³ ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница № 1, г. Екатеринбург, Россия

Резюме. Мотивацией исследования послужила уникальная ситуация, когда в одной семье было выявлено три случая синдрома Ди Джорджи, в том числе был обнаружен генетический дефект у матери, у которой фенотипических проявлений синдрома делеции 22 хромосомы ранее выявлено не было. Целью исследования стал анализ фенотипических манифестаций у членов этой семьи с синдромом делеции 22q11.2. Был проведен клинический анализ болезни, анамнеза жизни и генеалогии, были проведены общие клинические и биохимические исследования, сделаны иммунограммы, УЗИ тимуса, щитовидной железы, сердца и органов брюшной полости. Выявлено, что клинические проявления у всех трех человек из семьи различны при одном и том же генетическом дефекте.

Ключевые слова: синдром делеции 22q11.2, первичные иммунодефициты, семейный случай, MLPA, фенотип

FAMILIAL CASE OF CHROMOSOME 22q11.2 DELETION SYNDROME

Tuzankina I.A.^{a, b, c}, Deryabina S.S.^{a, b}, Vlasova E.V.^{b, c}, Bolkov M.A.^{a, b}

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

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

^c Regional Pediatric Clinical Hospital No. 1, Yekaterinburg, Russian Federation

Abstract. The work represents a family which includes two siblings with chromosome 22q11.2 deletion syndrome. Their mother carries the same chromosome anomaly, but with apparently normal phenotype. Hence, this interesting case of 22q11.2 deletion syndrome exists in 2 generations of the same family. The aim of this study was analysis of phenotypic manifestations in the family members with 22q11.2 deletion syndrome. Clinical examination of the patients, their life story and pedigree and, along with routine clinical and biochemical analysis, and immune state testing, along with ultrasound imaging of thymus and thyroid glands, heart and abdominal cavity. We made conclusions that the phenotypic features associated with chromosome 22q11.2 deletion may be different for distinct family members. Further studies are required to determine length of deleted segment and the genes affected, as well as to establish the genotype-phenotype interactions and disease prognosis.

Keywords: 22q11.2 deletion syndrome, immune deficiency syndromes, siblings, MLPA, phenotype

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

Адрес для переписки:

Тузанкина Ирина Александровна
ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии»
Уральского отделения РАН
620049, Россия, г. Екатеринбург, ул. Первомайская, 106.
Тел/факс: 8 (343) 374-00-70.
E-mail: ituzan@yandex.ru

Address for correspondence:

Tuzankina Irina A.
Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch,
Russian Academy of Sciences
620049, Russian Federation, Yekaterinbourg,
Pervomayskaya str., 106.
Phone/Fax: 7 (343) 374-00-70.
E-mail: ituzan@yandex.ru

Образец цитирования:

И.А. Тузанкина, С.С. Дерябина, Е.В. Власова, М.А. Болков
«Семейный случай синдрома Ди Джорджи (синдрома
делеции 22q11.2)» // Медицинская иммунология, 2017.
Т. 19, № 1. С. 95–100.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-95-100

© Тузанкина И.А. и соавт., 2017

For citation:

I.A. Tuzankina, S.S. Deryabina, E.V. Vlasova, M.A. Bolkov
“Familial case of chromosome 22q11.2 deletion syndrome”,
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2017, Vol. 19, no. 1, pp. 95–100.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-95-100

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2017-1-95-100>

Введение

Синдром делеции 22 хромосомы (chromosome 22q11.2 deletion syndrome) — это гетерогенная группа болезней, для которого характерна вариабельность фенотипических проявлений. Как и при других микроделеционных синдромах, при синдроме делеции 22q11 отмечается клинический полиморфизм с преобладанием таких признаков, как врожденные пороки сердца и магистральных сосудов, лицевые дизморфии, деформации твердого и мягкого неба, недоразвитие тимуса, отставание в физическом развитии, снижение показателей массы и роста, задержка психомоторного развития, гипоплазия паращитовидных желез, гипокальциемия, нарушения иммунитета [9, 13].

Согласно литературным данным, синдром делеции 22q11.2 встречается с частотой 1 на 3000-6000 живорожденных [11, 17], иногда частота синдрома в некоторых популяциях выше и может достигать 1 на 1000 [7, 12, 16], поражает оба пола одинаково, наследуется по аутосомно-доминантному типу. Около 93% пациентов имеют делецию, возникшую *de novo*, и только 7% пациентов наследуют ее от родителей [3, 4, 10].

Синдром делеции 22 хромосомы наиболее часто диагностируется в раннем детстве педиатрами как врожденное заболевание, выявление его впервые во взрослом возрасте происходит крайне редко. В литературе описано всего несколько случаев выявления синдрома делеции 22q11.2 у взрослых [2, 5, 6, 14]. Это может быть следствием низкой настороженности врачей различных специальностей к этому синдрому, а также вследствие высокого разнообразия его фенотипической манифестации и наличия легких форм.

Для генетической идентификации микроделеции участка 22q11.2 мы использовали метод MLPA, который имеет ряд преимуществ перед другими методами [1, 8, 15].

Мы предлагаем описание семейного случая выявления трех пациентов в одной семье с синдромом делеции 22q11.2, наблюдавшихся у жителей Уральского региона.

Материалы и методы

Под нашим наблюдением находится семья К., в которой 2 ребенка и их мать имеют микроделецию в регионе 22q11.2 хромосомы 22. Проведена оценка клинических признаков болезни, анализ анамнеза болезни и жизни, генеалогических данных у членов семьи с синдромом делеции 22q11.2.

Проведены общие осмотры, биохимические и иммунологические исследования, ультразвуковое сканирование сердца, тимуса, щитовидной железы и органов брюшной полости с использованием стационарного аппарата Vivid 7, General Electric Medical Systems (USA).

Подсчет субклассов лимфоцитов производили с помощью проточной цитометрии с окрашиванием моноклональными антителами (Beckman Coulter, США). Уровень сывороточных иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG) определяли с помощью турбодиметрии (автоматизированный биохимический анализатор Cobas Integra 400, Hoffman-La Roche Ltd).

Проведено молекулярно-генетическое исследование цельной крови девочки и ее родителей. Генетический материал мальчика (сухое пятно крови) было получено из архива Лаборатории неонатального скрининга Клинико-диагностического центра «Охрана здоровья матери и ребенка» (г. Екатеринбург).

Выделение ДНК из цельной крови производилось с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Germany). Выделение ДНК из сухого пятна производилось с использованием набора «ДНК-сорб-В» (АмплиПрайм, Россия).

Анализ делеции 22 хромосомы был проведен методом мультиплексной амплификации лигазно-связанных проб (MLPA) с использованием коммерческого набора SALSA MLPA probemix P250-B2 DiGeorge (MRC-Holland, The Netherlands), который содержит 48 различных MLPA-зондов, 29 из которых покрывают критический регион 22q11. Тестирование образцов проводили согласно инструкции фирмы-производителя (MRC-Holland) на генетическом анализаторе Applied Biosystems 3500 (USA). Компьютерные данные обрабатывали с помощью ПО Coffalyser (MRC-Holland).

Работа проводилась в соответствии с принципами добровольчества и конфиденциальности, в соответствии с Основами законодательства Российской Федерации «О здравоохранении» (22.07.1993 N 5487-1, ред. 07.12.2011) и Европейской конвенции о правах человека (1999-2000).

Результаты

Первым пациентом с генетически подтвержденным синдромом делеции 22q11.2, выявленным в описываемой семье, был мальчик — пациент Д. (рис. 1, см. 2-ю стр. цветной вклейки), наблюдавшийся в ОДКБ № 1 (Екатеринбург) с диагнозом: «Первичный иммунодефицит —

синдром Ди Джорджи. Гипоплазия тимуса. Врожденный порок сердца: общий артериальный ствол, дефект межжелудочковой перегородки» и умерший в возрасте 8,5 месяцев.

Из анамнеза: мальчик от первой беременности, порок сердца и задержка развития были выявлены пренатально. Родился на 38 неделе беременности путем кесарева сечения с весом 1885 г, ростом 43 см. До 1 месяца проводилась респираторная поддержка.

В лабораторных данных: количество клеток периферической крови было в физиологических пределах (табл. 1), наблюдалась гипогаммаглобулинемия, уровень кальция крови — на нижней границе нормы (табл. 2). При УЗИ тимуса выявлено уменьшение его размеров, диффузные паренхиматозные изменения, значительное уменьшение органа — расчетная масса 2 г. Мальчик оперирован на 42-й день жизни (радикальная коррекция общего артериального ствола, пластика ДМЖП, реконструкция путей оттока). Послеоперационный период был осложнен сепсисом, сердечно-легочной недостаточностью.

Получал заместительную терапию внутривенным иммуноглобулином G (интратект в дозе 400 мг/кг), антибиотикотерапию (сульперазон, максиприм, тиментин, ципрофлоксацин, бисептол) и флюконазол.

С 5 до 8,5 месяцев перенес три эпизода ОРВИ с тяжелым течением и дыхательной недостаточностью 2 степени, последний — в 8 мес., осложнившийся пневмонией, некротическим колитом, перитонитом, отеком головного мозга и резидуальным дефектом нижнего края заплаты меж-

желудочковой перегородки, что закончилось летальным исходом.

MLPA — анализ ДНК, выделенной из сухого образца крови 4-летней давности, взятого из архива Лаборатории неонатального скрининга подтвердил наличие микроделеционных нарушений критического региона хромосомы 22 у этого ребенка (ретроспективно).

Второй ребенок — девочка Л., от второй беременности, отягощенной гестозом, вторых родов в 34 недели гестации путем кесарева сечения. Вес при рождении 2190 г, рост 43 см. Проводилась респираторная поддержка до 3 месяца жизни. Попала под наблюдение в 1 год и 6 месяцев с диагнозом: «Первичный иммунодефицит — синдром Ди Джорджи. Гипоплазия тимуса. Врожденный порок сердца (артериальная септальная аневризма, трикуспидальная недостаточность III степени, не оперированный)».

Из объективных данных диспластичные черты лица: гипертелоризм, субмандибулизм (рис. 1, см. 2-ю стр. цветной вклейки). Частота сердечных сокращений 98 в мин. Размеры печени и селезенки в пределах физиологической нормы.

В лабораторных данных: клетки периферической крови, субпопуляции лимфоцитов, сахар и кальций крови в пределах физиологических значений, гипогаммаглобулинемия (табл. 1 и 2). При УЗИ тимуса выявлено снижение массы органа до 1,4 г. На первом году жизни переносила легкие эпизоды ринореи. В 1 год 3 месяца перенесла ОРВИ и отит в легкой форме.

Сравнительный анализ исследуемого и контрольных образцов генетического материала методом MLPA выявил изменения в количе-

ТАБЛИЦА 1. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ПОКАЗАТЕЛЕЙ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ Д. И Л.
TABLE 1. COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS D. AND L.

Возраст Patients age	Лейкоциты Leukocytes, 10 ⁹ /L	Лимфоциты Lymphocytes, %, 10 ⁹ /L	CD3 ⁺ лимфоциты CD3 ⁺ Lymphocytes, %, 10 ⁹ /L	CD4 ⁺ лимфоциты CD4 ⁺ Lymphocytes, %, 10 ⁹ /L	CD8 ⁺ лимфоциты CD8 ⁺ Lymphocytes, %, 10 ⁹ /L	CD16 ⁺ лимфоциты CD16 ⁺ Lymphocytes, %, 10 ⁹ /L	CD19 ⁺ лимфоциты CD19 ⁺ Lymphocytes, %, 10 ⁹ /L
Д., 1 мес. Patient D, 1 month	6,0	42% 2,52	66% 1,66	46% 1,16	12% 0,30	7% 0,18	24% 0,60
Л., 1 мес. Patient L, 1 month	6,35	60% 3,81	58% 2,21	38% 1,45	15% 0,57	16% 0,61	24% 0,91

ТАБЛИЦА 2. ПОКАЗАТЕЛИ УРОВНЯ СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ, КАЛЬЦИЯ И ГЛЮКОЗЫ У ПАЦИЕНТОВ

TABLE 2. LEVELS OF SERUM ANTIBODIES, CALCIUM, AND GLUCOSE IN THE PATIENTS

Пациент, возраст Patient, age	IgA IgA, mg/dl	IgM IgM, mg/dl	IgG IgG, mg/dl	Глюкоза Glucose, mmol/l	Ca Ca, mmol/l
Д., 1 мес. D, 1 month	0	25	160	4,8	2,1
Л., 1 мес. L, 1 month	0	14	300	4,5	2,5
Т., 34 года T, 34 years	500	180	1400	4,3	2,3

стве генетического материала у пробанда в регионе q11.2 хромосомы 22. Обнаруженная делеция находилась в стартовом районе региона Ди Джорджи (LCR22-A) и включала гены CLTCL1, HIRA, CDC45, CLDN5, GP1BB, TBX1, TXNRD2, DGCR8 (рис. 2, см. 2-ю стр. цветной вклейки).

Мать детей — пациентка Т., 34 года, родилась в одном из регионов Казахстана с высокой радиационной нагрузкой. В анамнезе несколько перенесенных пневмоний в возрасте до 10 лет. В последующем — редкие эпизоды ОРВИ. Отличается диспластичными чертами лица (гипертелоризм, грушевидный нос), короткой шеей (рис. 3, см. 2-ю стр. цветной вклейки). Рост 155 см, масса тела 97 кг, индекс массы тела 40,37. У пациентки было две беременности, в 28 и 31 год, обе разрешившиеся посредством кесарева сечения детьми с синдромом делеции 22 хромосомы. С 20-ти лет страдает артериальной гипертензией, регистрируемые значения давления 150/90 мм рт. ст.

В лабораторных данных: клетки периферической крови на момент обследования в нормативных пределах, иммуноглобулины — с тенденцией к увеличению IgA, биохимические показатели в пределах нормативных значений (табл. 2). УЗИ сердца — патологии не выявлено, УЗИ тимуса — 2 солидные кисты, УЗИ брюшной полости — стеатоз печени.

При проведении генетического исследования обнаружена делеция в начальной области региона Ди Джорджи (LCR22-A), идентичная делеции, выявленной у дочери и сына.

В образце отцовской ДНК (пациент А., 36 лет) микроструктурных нарушений данного региона не выявлено. Все показатели физического состояния мужчины в пределах нормы, однако обращают на себя внимание некоторые особенности лицевого скелета (рис. 3, см. 2-ю стр. цветной вклейки).

Обсуждение

В описанном семейном случае у мамы и дочери выявлен так называемый мягкий фенотип заболевания, при котором обе пациентки живы, а у матери сохранена фертильность. Третий случай в этой семье у мальчика, который имел более выраженный фенотип: задержка физического развития, ВПС, гипоплазия тимуса, признаки комбинированного иммунодефицита, подвергался оперативной коррекции порока, перенес сепсис в послеоперационном периоде, несколько эпизодов вирусных инфекций, тяжелую вирусно-бактериальную пневмонию с некротическим колитом и серозным перитонитом, приведшие к летальному исходу. Данные события можно объяснить тяжестью ВПС и сложностью оперативного пособия, а также проявлением иммунодефицита. Сестра мальчика имеет сниженный уровень иммуноглобулинов. У матери наблюдаются нормальные количества субклассов Т лимфоцитов и иммуноглобулинов, отсутствуют частые инфекционные эпизоды в настоящее время, но отмечено наличие повторных пневмоний в возрасте до 10 лет.

Известно, что врожденные пороки развития, особенно ВПС, могут быть фенотипическим маркером синдрома делеции 22q11. Однако, отсутствие ВПС не исключает синдром делеции 22q11. При этом форма порока и связанные с этим проявления сердечной недостаточности могут быть различными. В описываемом нами случае у мальчика был общий артериальный ствол (truncus arteriosus) с формированием сердечной недостаточности, который потребовал оперативной коррекции. У его сестры — аневризма межпредсердной перегородки, и регургитация трикуспидального клапана III степени, не требующие оперативного вмешательства. У матери этих детей порока сердца нет, однако у ее сестры

(тетя детей) — врожденный порок сердца в виде дефекта межпредсердной перегородки.

Кроме того, в родословной членов представленной нами семьи К. встречались родственники с хромосомными болезнями, проявлениями атипичных инфекционно-воспалительных процессов, врожденными пороками развития (пороки сердца), патологией репродукции, эндокринопатией, а также случаями детских смертей (данные не указаны). Вполне вероятно, что подобные признаки могут расцениваться как генеалогические маркеры наследственных болезней.

Это первый семейный случай выявления синдрома делеции 22q11.2 в Свердловской области.

Учитывая непостоянство клинических проявлений заболевания, так называемый клинический полиморфизм, представляется очень важным накопление знаний о данном синдроме, способствующих более раннему его распознаванию у пациентов со «стертым» фенотипом, учет семейного анамнеза, своевременное проведение молекулярно-генетического тестирования, а также ранняя терапия, что в целом поможет избежать серьезных, угрожающих жизни осложнений и существенно улучшить качество жизни и социальную адаптацию пациентов с синдромом делеции 22q11.2.

Список литературы / References

1. Дерябина С.С., Каракина М.Л., Тузанкина И.А. Метод MLPA в выявлении семейного случая синдрома делеции 22 хромосомы // Вестник уральской медицинской академической науки, 2014. Т. 3, № 49. С. 206-208. [Deriabina S.S., Karakina M.L., Tuzankina I.A. MLPA method in identifying a family case of chromosome 22 deletion syndrome. *Vestnik ural'skoy meditsinskoy akademicheskoy nauki – Bulletin of Ural Medical Academic Science*, 2014, Vol. 3, no. 49, pp. 206-208. (In Russ.)]
2. Bassett A.S., Chow E.W.C., Husted J., Weksberg R., Caluseriu O., Webb G.D., Gatzoulis M.A. Clinical features of 78 adults with 22q11 deletion syndrome. *American Journal of Medical Genetics*, 2005, Vol. 138, no. 4, pp. 307-313.
3. Beverly S. Emanuel. Molecular mechanisms and diagnosis of chromosome 22Q11.2 rearrangements. *Dev. Disabil. Res. Rev.*, 2008, Vol. 14, no. 1, pp. 11-18.
4. Botta A., Amati F., Novelli G. Causes of the phenotype-genotype dissociation in DiGeorge syndrome: Clues from mouse models. *Trends in Genetics*, 2001, Vol. 17, no. 10, pp. 551-554.
5. Cohen E., Chow E.W.C., Weksberg R., Bassett A.S. Phenotype of adults with the 22q11 deletion syndrome: A review. *Am. J. Med. Genet.*, 1999, Vol. 86, pp. 359-365.
6. Fung W.L.A., Butcher N.J., Costain G. Practical guidelines for managing adults with 22q11.2 deletion syndrome. *Genetics in Medicine: official journal of the American College of Medical Genetics*, 2015, Vol. 17, no. 8, pp. 599-609.
7. Gross S.J., Bajaj K., Garry D. Rapid and novel prenatal molecular assay for detecting aneuploidies and microdeletion syndromes. *Prenat. Diagn.*, 2011, Vol. 31, pp. 259-266.
8. Jalali G.R., Vorstman J.A., Errami Ab, Vijzelaar R., Biegel J., Shaikh T., Emanuel B.S. Detailed analysis of 22q11.2 with a high density MLPA probe set. *Human Mutation*, 2008, Vol. 29, no. 3, pp. 433-440.
9. Kobrynski L.J., Sullivan K.E. Velocardiofacial syndrome, Di-George syndrome: the chromosome 22q11.2 deletion syndromes. *Lancet*, 2007, Vol. 370, pp. 1443-1452.
10. McDonald-McGinn D.M., Tonnesen M.K., Laufer-Cahana A., Finucane B., Driscoll D.A., Emanuel B.S., Zackai E.H. Phenotype of the 22q11.2 deletion in individuals identified through an affected relative: cast a wide FISHing net! *Genet. Med.*, 2001, Vol. 3, pp. 23-29.
11. Oskarsdottir, Vujic, Fasth. Incidence and prevalence of the 22q11 deletion syndrome: a population-based study in Western Sweden. *Arch. Dis. Child*, 2004, Vol. 89, pp. 148-151.
12. de Decker R., Bruwer Z., Hendricks L., Schoeman M., Schutte G., Lawrenson J. Predicted v. real prevalence of the 22q11.2 deletion syndrome in children with congenital heart disease presenting to Red Cross War Memorial Children's Hospital, South Africa: A prospective study. *S. Afr. Med. J.*, 2016, Vol. 106, no. 6, p. 11003.
13. Schwinger E., Devriendt K., Rauch A., Philip N. Clinical utility gene card for: DiGeorge syndrome, velocardiofacial syndrome, Shprintzen syndrome, chromosome 22q11.2 deletion syndrome (22q11.2, TBX1). *Eur. J. Hum. Genet.*, 2010, Vol. 18, no. 9, pp. 1-3.

14. Seung Kyung Lee, Min Jeong Lee, Hyo Jin Lee, Bu Kyung Kim, Young Bae Sohn, Yoon-Sok Chung. A Case of CATCH22 syndrome diagnosed in postmenopausal woman. *J. Bone Metab.*, 2013, Vol. 1, no. 20, pp. 57-60.
15. Vorstman J.A.S., Jalali G.R., Rappaport E.F. Hacker A.M., Scott C., Emanuel B.S. MLPA: A rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. *Human Mutation*, 2006, Vol. 27, no. 8, pp. 814-821.
16. Wapner R.J., Martin C.L., Levy B., Ballif B.C., Eng C.M., Zachary J.M., Savage M., Platt L.D., Saltzman D., Grobman W.A., Klugman S., Scholl T., Simpson J.L., McCall K., Aggarwal V.S., Bunke B., Nahum O., Patel A., Lamb A.N., Thom E.A., Beaudet A.L., Ledbetter D.H., Shaffer L.G., Jackson L. Chromosomal microarray versus karyotyping for prenatal diagnosis. *N. Engl. J. Med.*, 2012, Vol. 367, pp. 2175-2184.
17. Wilson D.I., Cross I.E., Wren C. Minimum prevalence of chromosome 22q11 deletions. *Am. J. Hum. Genet.*, 1994, Vol. 55, A169.

Авторы:

Тузанкина И.А. — д.м.н., профессор, главный детский иммунолог Минздрава Свердловской области, главный научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; ведущий научный сотрудник кафедры иммунохимии ФГАОУ 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

Дерябина С.С. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; научный сотрудник кафедры иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Власова Е.В. — к.м.н., заведующая отделением клинической иммунологии ГБУЗ СО Областная детская клиническая больница № 1; ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН, г. Екатеринбург, Россия

Болков М.А. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории иммунологии воспаления ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» Уральского отделения РАН; старший научный сотрудник кафедры иммунохимии Химико-технологического института ФГАОУ ВПО «Уральский федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина», г. Екатеринбург, Россия

Authors:

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

Deryabina S.A., Junior Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Yekaterinburg, Russian Federation

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

Bolkov M.A., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Inflammation Immunology, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Department of Immunochemistry, B. Yeltsin Ural Federal University, Yekaterinburg, Russian Federation

Поступила 08.07.2016
Принята к печати 31.08.2016

Received 08.07.2016
Accepted 31.08.2016

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-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление. — 2012. — Т. 11, №1. — С. 64–69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. — М.: Анахарсис, 2009. — 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. *Moscow: Anacharsis*, 2009, 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. *Basic and Clinical Immunology*. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. 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. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. 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, отображаемых 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 специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

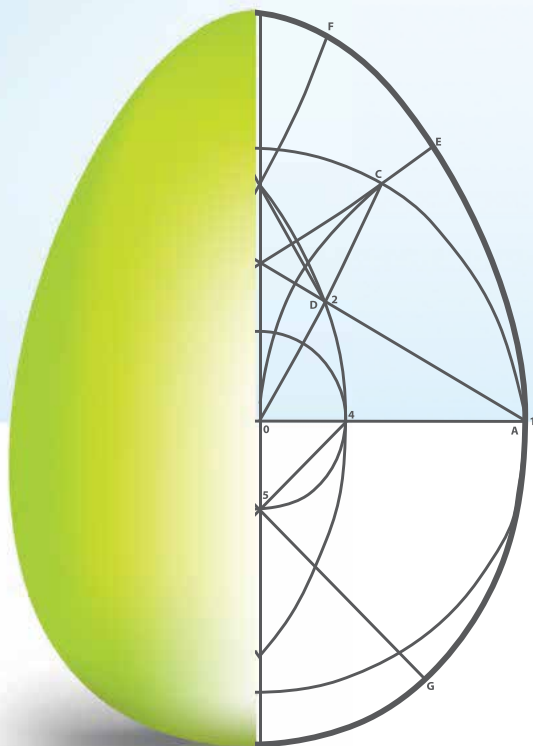
Абакушина Е.В.	81	Зенин И.В.	35	Посвятенко А.В.	81
Антонюк М.В.	65	Калинина Е.П.	65	Романов А.А.	89
Барабаш Е.Ю.	65	Карпук И.Ю.	55	Савченко А.А.	45
Белякова К.Л.	19	Кибардин А.В.	81	Сельков С.А.	19
Болков М.А.	95	Корнева Н.В.	73	Симакова А.И.	35
Борисов А.Г.	45	Кравченко (Семакова) П.Н.	89	Скляр Л.Ф.	35
Власова Е.В.	95	Кудрявцев И.В.	45	Соколов Д.И.	19
Гвоздев И.И.	45	Лысюк Е.Ю.	81	Соколова Т.М.	27
Гвозденко Т.А.	65	Маркелова Е.В.	35	Старшинова А.А.	73
Горелова И.С.	35	Медведев А.Ю.	45	Тузанкина И.А.	95
Денисенко Ю.К.	65	Михайлова В.А.	19	Харит С.М.	73
Дерябина С.С.	95	Мошев А.В.	45	Ходосова К.К.	65
Довгалюк И.Ф.	73	Новгородцева Т.П.	65	Черных Е.Р.	7
Дрозденко Т.С.	73	Олейник В.М.	89	Чуров А.В.	89
Ершов Ф.И.	27	Олейник Е.К.	89	Шевела Е.Я.	7
Жулай Г.А.	89	Останин А.А.	7	Шувалов А.Н.	27
Здзитовецкий Д.Э.	45	Полосков В.В.	27		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активирующий рецептор NKG2D	82	неоптерин	55
активные формы кислорода	46	первичные иммунодефициты	95
ангиогенез	7	перитонит	46
беременность	19	пневмококковая вакцина	73
биомаркер	55	поверхностные рецепторы	19
бронхиальная астма	65	регенеративная иммунотерапия	7
вакцинация	73	респираторный взрыв	46
гены TLR/RLRs	27	семейный случай	95
дети	73	синдром делеции 22q11.2	95
децидуальные NK-клетки	19	степени контроля	65
диагностика	55, 73	стресс-индуцированные молекулы MICA	82
динамика послеоперационного периода	46	тканевой ингибитор матриксной	
дифференцировка	19	металлопротеиназы	35
дифференцировка PMA	27	туберкулезная инфекция	73
ДЦП	7	фагоцитоз	46
иммунитет	73	фенотип	95
иммунная система	65	фиброз печени	35
иммунорегуляция	65	функциональные фенотипы	7
ингибирование NKG2D	82	хронический гепатит С	35
инсульт	7	хронический периодонтит	55
интерферон-γ	55	цитокины	19, 27, 65
клетки THP-1	27	ЦНС	7
колоректальный рак	89	эктонуклеотидаза CD39	89
макрофаги	7, 27	A2AR	89
макрофаги моноцитарного происхождения	7	MLPA	95
матриксная металлопротеиназа	35	NKG2D лиганды	82
микроглия	7	NK-клетки	19, 82
нейропротекция	7	NK-клетки матки	19
нейрорегенерация	7	TLR-агонисты	27
нейтрофилы	46, 65	Treg-клетки	89



привиджен



- Первый и единственный ВВИГ*, стабилизированный пролином^{1,2}
- Готовый к применению 10% раствор ВВИГ¹
- Хорошо переносится даже при высокой скорости инфузии^{1,2}
- Может храниться при комнатной температуре в течение 3-х лет¹

Совершенство в простоте

Biotherapies for Life™ **CSL Behring**

* ВВИГ – внутривенный иммуноглобулин

КРАТКАЯ ИНФОРМАЦИЯ ПО МЕДИЦИНСКОМУ ПРИМЕНЕНИЮ ПРЕПАРАТА ПРИВИДЖЕН

Иммуноглобулин человека нормальный в виде 10% раствора, содержит не менее 98% IgG.

Показания. Заместительная терапия при: 1) первичных иммунодефицитах, таких как врожденные агаммаглобулинемия и гипогаммаглобулинемия, общая переменная иммунная недостаточность, тяжелая комбинированная иммунная недостаточность, синдром Вискотта-Олдрича; 2) множественной миеломе с тяжелой формой вторичной гипогаммаглобулинемии и рецидивирующими бактериальными инфекциями при неэффективности вакцинации пневмококковой вакциной; 3) хроническом лимфоидном лейкозе с тяжелой формой вторичной гипогаммаглобулинемии и рецидивирующими бактериальными инфекциями при неэффективности профилактической антибактериальной терапии; 4) врожденном синдроме приобретенного иммунодефицита человека у детей при наличии рецидивирующих инфекций; 5) гипогаммаглобулинемии у пациентов с аллогенной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток. Иммуномодулирующая терапия при: 1) идиопатической тромбоцитопенической пурпуре; 2) синдроме Гийена-Барре; 3) болезни Kawasaki; 4) хронических воспалительных демиелинизирующих полинейропатиях. **Противопоказания.** Гиперчувствительность к действующему веществу или любому другому компоненту, входящему в состав препарата;

повышенная чувствительность к гомологичным иммуноглобулинам, особенно в очень редких случаях дефицита иммуноглобулина А (IgA), когда у пациента присутствуют антитела к IgA; гиперпролинемия. **Особые указания.** Только для внутривенного применения. Нельзя смешивать с другими лекарственными средствами и с 0,9% раствором натрия хлорида, разрешается разведение 5% раствором декстрозы. Следует тщательно соблюдать скорость введения препарата (максимально 12 мг/кг массы тела/мин). Раствор не содержит консервантов, после вскрытия содержимое флакона необходимо использовать в течение 24 часов. **Побочное действие.** В связи с внутривенным способом применения препарата нечасто возникали такие нежелательные реакции, как озноб, головная боль, лихорадка, рвота, аллергические реакции, тошнота, боль в суставах, снижение артериального давления и умеренные боли в спине. Редко возникали реакции гиперчувствительности с резким снижением артериального давления и в отдельных случаях анафилактическим шоком. Большинство нежелательных реакций были легкими или среднетяжелыми. Установленные тяжелые нежелательные реакции могут быть связаны со скоростью введения препарата. **ПОЖАЛУЙСТА, ОЗНАКОМЬТЕСЬ С ПОЛНОЙ ИНСТРУКЦИЕЙ ПО ПРИМЕНЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПЕРЕД ЕГО НАЗНАЧЕНИЕМ.¹**

Список литературы: 1. Инструкция по применению лекарственного препарата для медицинского применения ПРИВИДЖЕН. Регистрационный номер ЛП-002452. 2. Stein MR, Nelson RP, Church J et al. Safety and Efficacy of Privigen, a Novel 10% Liquid Immunoglobulin Preparation for Intravenous Use, in Patients with Primary Immunodeficiencies. *J Clin Immunol* 2009; 29: 137-144.

Филиал ООО «Си Эс Эл Беринг Биотерапис ГмБХ»

125167, Москва, Ленинградский пр., д. 39, стр. 80. Эл. почта: inforussia@csllbehring.com. Тел.: +7 (495) 788-52-89

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

