

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

Том 19, № 3. С. 219-322

2017

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

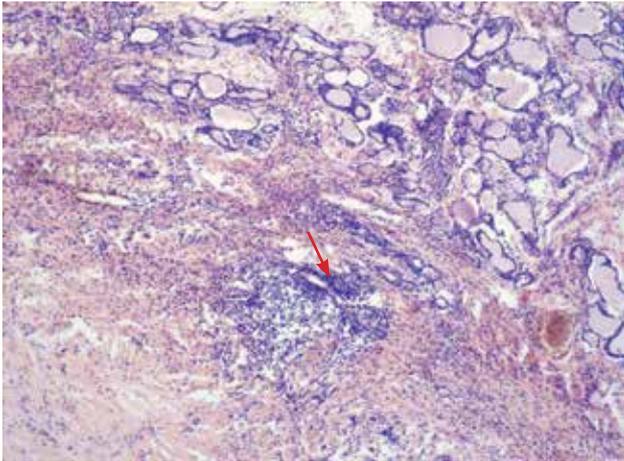


Рисунок 1. Щитовидная железа крысы с тиреотоксикозом после стимуляции рекомбинантным IL-2

Примечание. Очаговая лимфоидная инфильтрация стромы ЩЖ (красные стрелки). Окраска – гематоксилин-эозин. Ув. x100.

Figure 1. Rat thyroid pattern in thyrotoxicosis following stimulation by recombinant IL-2

Note. Focal lymphoid infiltration of thyroid gland stroma (red arrows). H&E staining, 100x magnification.

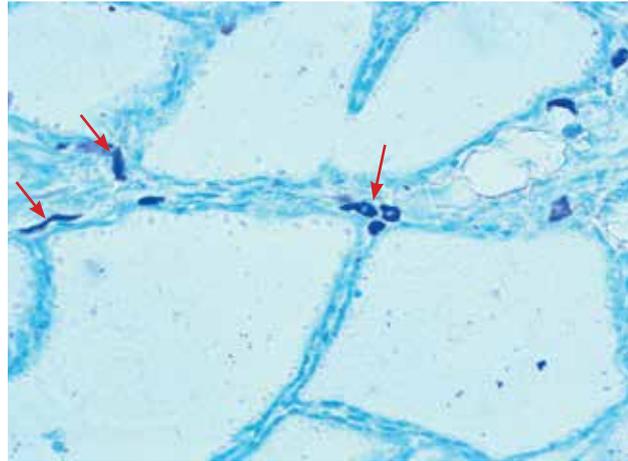


Рисунок 2. Щитовидная железа крысы с гипотиреозом

Примечание. Единичные интерфолликулярные МС тесно прилежали к клеткам фолликулярного эпителия и дегранулируют между пролиферирующими тиреоцитами (указано стрелками). Окраска толуидиновым синим. Ув. x400.

Figure 2. Rat thyroid pattern in hypothyroidism

Note. Single interfollicular mast cells adjoin closely with follicular epithelium cells and degranulate among proliferating thyrocytes (marked with arrows). Staining with Toluidine Blue; 400x magnification.

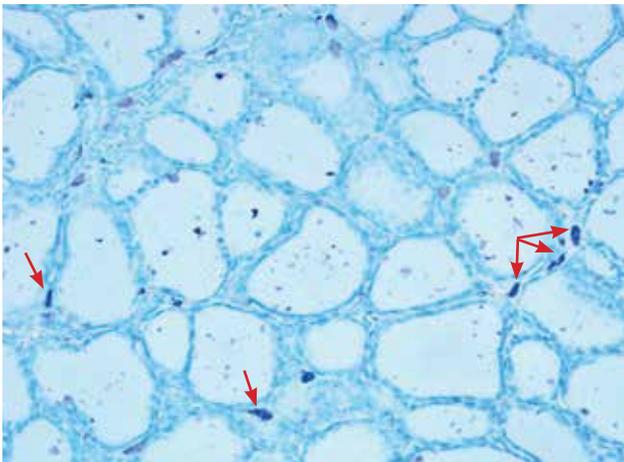


Рисунок 3. Щитовидная железа крысы с тиреотоксикозом

Примечание. Интер- и перифолликулярные группы дифференцированных мастоцитов, некоторые в состоянии дегрануляции цитоплазмы (указано стрелками). Окраска – толуидиновым синим. Ув. x400.

Figure 3. Rat thyroid pattern in thyrotoxicosis

Note. Inter- and the perifollicular differentiated mast cell groups; some of them undergo degranulation (marked with arrows). Staining with Toluidine Blue; 400x magnification.

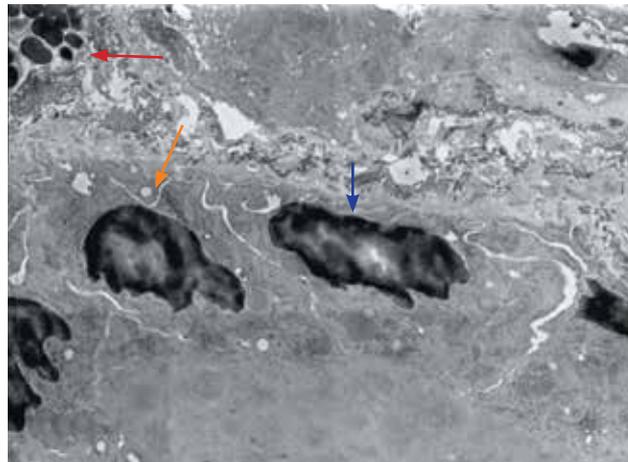


Рисунок 4. Электронная микроскопия щитовидной железы крысы с тиреотоксикозом

Примечание. Стрелка красного цвета обозначает мастоцит с гранулами секрета, оранжевая стрелка обозначает тиреоцит; синяя стрелка обозначает ядро тиреоцита. Ув. x1200.

Figure 4. Rat thyroid pattern in thyrotoxicosis, electron microscopy

Note. Red arrow marks a mast cell with secretion granules; orange arrow, a thyrocyte; blue arrow, thyrocyte nucleus. 400x magnification.

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

май-июнь

2017, том 19

№ 3

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 последиplomного образования Минздрава России, Москва, Россия

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

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

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

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

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, 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@spb-rai.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 05.05.2017 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 13. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1101

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

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

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

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**

May-June

2017, volume 19

No. 3

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. Chukhlovin, 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, Malyi persp. Vasilevsky Island, 26, office 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 05.05.2017. 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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Козлов В.А., Демина Д.В.

ТРИПТОФАН И INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO) В ПАТОГЕНЕЗЕ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ 225

Жидкова И.И., Понасенко А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Барбараш О.Л.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ (ГЕНЫ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА – TLRs) В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА И ЕГО ОСЛОЖНЕНИЙ..... 241

Оригинальные статьи

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

ИНТЕРФЕРОН-АЛЬФА-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДЕКСАМЕТАЗОНУ 255

Галимова Э.С., Кинго К., Кокс С.

МИССЕНС-МУТАЦИЯ Gln11Leu ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 7 И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ПСОРИАЗУ 267

Кузьмина Е.Г., Зацаренко С.В.

МНОГОФАКТОРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА В ВЫЯВЛЕНИИ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ И АЛЛЕРГИИ 275

Соколов Д.И., Белякова К.Л., Михайлова В.А., Шиленкова Ю.В., Худинян М.М., Окорокова Л.С., Беликова М.Е., Сельков С.А.

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ПЛАЦЕНТОЙ, НА ФОРМИРОВАНИЕ СОСУДОПОДОБНЫХ СТРУКТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА..... 285

Здор В.В., Маркелова Е.В., Гельцер Б.И.

ТИРЕОИДНЫЙ СТАТУС И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИММУНОЦИТОВ 293

Прохоренко Т.С., Зима А.П., Саприна Т.В., Новицкий В.В., Тодосенко Н.М., Литвинова Л.С.

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС БЕРЕМЕННЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ 301

Краткие сообщения

Алексенко Е.Ю., Цвингер С.М.

УРОВЕНЬ ПРОВΟΣПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И СОСТОЯНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ БОЛИ..... 307

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

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СПЕКТРА У БОЛЬНЫХ НЕАЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СОЧЕТАНИИ С СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА 313

Правила для авторов 319

Авторский указатель 322

Предметный указатель 322

CONTENTS

Reviews

Kozlov V.A., Demina D.V.

TRYPTOPHAN AND INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO) IN PATHOGENESIS OF IMMUNOSUPPRESSIVE CLINICAL CONDITIONS 225

Zhidkova I.I., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Barbarash O.L.

GENOMIC FACTORS (TOLL-LIKE RECEPTORS GENES) IN DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS AND ITS CLINICAL MANIFESTATIONS 241

Original articles

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

IFN α -INDUCED DENDRITIC CELLS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND THEIR SENSITIVITY TO DEXAMETHASONE 255

Galimova E.S., Kingo K., Köks S.

TOLL-LIKE RECEPTOR 7 GENE Gln11Leu MISSENSE-MUTATION AND SUSCEPTIBILITY TO PSORIASIS 267

Kuzmina E.G., Zatsarenko S.V.

MULTIVARIATE MODELLING OF THE IMMUNE STATUS IN DETECTION OF SECONDARY IMMUNODEFICIENCY AND THE ALLERGY 275

Sokolov D.I., Belyakova K.L., Mikhailova V.A., Shilenkova Yu.V., Khudinyan M.M., Okorokova L.S., Belikova M.E., Selkov S.A.

EFFECTS OF PLACENTAL FACTORS UPON DEVELOPMENT OF TUBULAR STRUCTURES BY ENDOTHELIAL CELLS IN PRESENCE OF TROPHOBLASTIC CELLS 285

Zdor V.V., Markelova E.V., Geltser B.I.

THYROID STATUS AND ITS CORRELATION WITH THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF IMMUNOCYTES 293

Prokhorenko T.S., Zima A.P., Saprina T.V., Novitskiy V.V., Todosenko N.M., Litvinova L.S.

CYTOKINE PROFILE IN PREGNANT WOMEN WITH METABOLIC DISORDERS 301

Short communications

Aleksenko E.Yu., Tsvinger S.M.

PROINFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS AND INDEXES OF ENDOTHELIAL FUNCTION IN PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS IS DEPENDENT ON THE PAIN INTENSITY 307

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

CYTOKINE PROFILE FEATURES IN THE PATIENTS WITH NONALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA WITH CO-EXISTING TYPE 2 DIABETES MELLITUS 313

Instructions to Authors 319

Author index 322

Subject index 322

ТРИПТОФАН И INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO) В ПАТОГЕНЕЗЕ ИММУНОКОМПРОМЕТИРОВАННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Козлов В.А., Демина Д.В.

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

Резюме. Все больше и больше литературных данных свидетельствуют о ведущей роли в формировании иммуносупрессорных механизмов фермента indoleamin 2,3-deoxygenase (IDO), которая продуцируется в основном дендритными клетками, в индукции которой участвует в основном IFN γ и функции которой состоят в индукции катаболизма незаменимой аминокислоты триптофана. Уже одно снижение уровня триптофана в околкеклеточной среде обуславливает подавление ряда функций клеток иммунной системы и индукцию регуляторных Т-клеток. Появление ряда катаболитов триптофана еще более усугубляет иммунодепрессивное состояние, индуцированное повышенной экспрессией IDO. Предполагается, что цепочка из IDO, триптофана и его катаболитов в значительной степени определяет формирование гипертупрессорного состояния при опухолевом росте и гипо- (или недостаточного) супрессорного состояния при аутоиммунных и аллергических заболеваниях. Отсюда вытекают и новые задачи в терапии: найти способы терапии, направленные на снижение активности фермента IDO, участвующего в индукции клеток-супрессоров при опухолевом росте, и в то же время направленные на стимуляцию активности данного фермента для повышения супрессорной активности регуляторных клеток.

Ключевые слова: иммунопатология, иммуносупрессия, триптофан, indoleamine 2,3-dioxygenase, кинуренин

TRYPTOPHAN AND INDOLEAMINE-2,3-DIOXYGENASE (IDO) IN PATHOGENESIS OF IMMUNOSUPPRESSIVE CLINICAL CONDITIONS

Kozlov V.A., Demina D.V.

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

Abstract. Increasing amounts of literature data suggest the leading role of indoleamine 2,3-deoxygenase (IDO) enzyme in regulation of immunosuppressive mechanisms. IDO is produced, mostly, by dendritic cells, being induced, e.g., under IFN γ involvement. Its function is to provide catabolism of tryptophan, an essential amino acid. Any reduction of tryptophan levels in extracellular environment was shown to cause functional suppression of certain immune cells, and induction of T regulatory cells. Accumulation of different tryptophan catabolites may exacerbate the immunosuppressive status induced by increased IDO expression. It is assumed

Адрес для переписки:

Козлов Владимир Александрович
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская, 14.
Тел.: 8 (383) 222-66-27.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: vakoz40@yandex.ru

Address for correspondence:

Kozlov Vladimir A.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrintsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 222-66-27.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: vakoz40@yandex.ru

Образец цитирования:

В.А. Козлов, Д.В. Демина «Триптофан и indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) в патогенезе иммунокомпрометированных заболеваний» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 225-240.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-225-240
© Козлов В.А., Демина Д.В., 2017

For citation:

V.A. Kozlov, D.V. Demina "Tryptophan and indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) in pathogenesis of immunosuppressive clinical conditions", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 225-240. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-225-240
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-225-240

that the interactions between IDO, tryptophan and its catabolites largely determine a development of hyper-suppressor state in tumor growth and a hypo- (or lack of) suppressor status in autoimmune and allergic diseases. This implies some novel tasks for the therapy, including a treatment aimed for reduction of the IDO activity since the latter is involved in suppressor cell induction during tumor growth. Respectively, stimulation of IDO activity may augment suppressor activity of the regulatory cells.

Keywords: immunopathology, immunosuppression, tryptophan, indoleamine 2,3-dioxygenase, kynurenine

Речь в данном обзоре пойдет о внутриклеточном несекретируемом ферменте indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO), основная активность которого базируется на его способности индуцировать катаболизм триптофана (Три) с образованием целого ряда продуктов, оказывающих существенное влияние на функции иммунной системы. Описаны три фермента, катаболизирующие Три: tryptophan 2,3-dioxygenase, indoleamine 2,3-dioxygenase 1 и 2. IDO1 и IDO2. Гены последних двух ферментов располагаются тандемом на хромосоме 8p21, являясь структурно и эволюционно родственными белками [40]. Впервые антипролиферативный эффект IDO (42kD мономерный протеин) в отношении бактерий, простейших и опухолевых клеток был описан в 1984 г. [55], а через 5-6 лет был описан индуцирующий эффект $IFN\gamma$ на экспрессию фермента в макрофагах [76, 83]. Первые знания функции IDO касались противомикробного эффекта. Несколько позднее было показано, что IDO играет центральную роль в одном из самых загадочных явлений природы, беременности, т. е. способности материнского организма сохранять в течение 9 мес. (у человека) генетически чужеродный организм в себе. Оказалось, что именно IDO индуцирует состояние иммунологической толерантности к аллоантигенам плода, подавляя активность Т-лимфоцитов матери в своеобразной реакции хозяин против трансплантата [44].

Немного про indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO)

Сейчас известно, что IDO экспрессируется в различных тканях организма, таких как плацента и легкие (эндотелиальные клетки), в эпителиальных клетках генитального тракта у женщин, в лимфоцитах, макрофагах, дендритных клетках (ДК) в лимфоидной ткани, трофобластах, клетках-супрессорах миелоидного происхождения (КСМП), стволовых мезенхимальных клетки (СМК) [77]. При определенных условиях экспрессировать IDO могут также фибробласты, Т- и В-лимфоциты и др. [13]. IDO имеет высокую аффинность к Три ($K_m \sim 0,02 \text{ mM}$), что способствует быстрому катаболизму Три и снижению его уровня в клеточном окружении. Наиболее употребляемый метод оценки активности фермента состоит в определении уровней в периферической крови и других жидкостях организма кинуренина (Кин – основной продукт катаболизма триптофана) и Три. Изменения соотношения Кин/Три и будут свидетельствовать об изме-

нении активности и/или увеличении продукции IDO. Однако в близких к нормальным условиям начальные повышения Кин могут не выявляться в силу эффективного его катаболизма в печени за счет активности в ней фермента TDO (tryptophan 2,3-dioxygenase), который также участвует в катаболизме Три. В таких условиях больше информации можно получить с помощью определения в сыворотке продукта катаболизма самого Кин – квинолининовой кислоты (quinolinic acid) [71].

Считается, что $IFN\gamma$ является основным индуктором экспрессии IDO в самых различных клетках, в которых (IDO) начинает катаболизм Три. Промотор гена *Ido* (кодирует IDO) содержит одиночный активный участок, специфичный для $IFN\gamma$, и два неспецифических элемента, стимулирующих IFN -ответ, которые могут отвечать к $IFN\alpha$ и $IFN\beta$, так же как к $IFN\gamma$. Показано, что $IFN\gamma$ в десятки раз потентнее в индукции IDO в различных клетках по сравнению с $IFN\alpha$ и $IFN\beta$ [19]. И в то же время в ДК совместное введение $IFN\gamma$ и $IFN\alpha$ оказывает аддитивный или даже синергичный эффект на индукцию фермента [59]. Многие механизмы индукции IDO опосредуются TLR. Стимуляция через TLR3 и TLR4 индуцирует экспрессию IDO в ДК, а стимуляция через TLR7/8 – в моноцитах. Лигация TLR3/4 через канонический путь стимуляции NF- κ B с участием фактора транскрипции IRF3 (interferon regulatory factor) индуцирует синтез TNF α и $IFN\beta$, которые в дальнейшем и стимулируют экспрессию IDO [40]. При этом TNF α на уровне экспрессии гена IDO оказывает стимулирующий эффект на индуцирующее влияние $IFN\gamma$ [62]. Не остается в стороне и TLR9, лигация которого, например CpG-обогащенным олигонуклеотидами (CpG-ODN), также может индуцировать экспрессию IDO с последующим накоплением Treg [19]. Простагландин E_2 является участником индукции IDO в мДК [58]. Главное, следует подчеркнуть, что в индукции экспрессии IDO участвуют разные факторы, через различные механизмы, однако функция синтезированных молекул IDO при этом не меняется. В продолжении процесса катаболизма Три, начатого IDO, принимает участие целый ряд ферментов, специфичных для каждой стадии катаболизма Три (indoleamine dioxygenase, kynureninase, kynurenine monooxygenase, 3-hydroxyanthranilate 3,4-dioxygenase). Оказалось, что $IFN\gamma$ в ДК прак-

тически одновременно индуцирует экспрессию этой цепочки ферментов, которые отвечают в виде скоординированного кластера генов [41]. Более того, IFN γ способен индуцировать экспрессию данной цепочки генов в CD8-ДК у мышей при отсутствии индукции в них IDO, когда эти ДК поглощают Кин, продуцированными другими ДК, в которых Кин образовывался из Три под влиянием IDO. При этом они сами становятся толерогенными клетками за счет образования в них продуктов катаболизма Кин, таких как quinolinate, обладающих иммуносупрессорной активностью [4].

Незаменимая аминокислота триптофан и ее катаболизм

Необходимо обратить особое внимание на то, что само по себе понимание функциональной активности IDO никак не отделимо от знаний о роли триптофана в организме. Во-первых, триптофан является незаменимой аминокислотой, которая не синтезируется в организме человека, т. е. человек является ауксотрофом в отношении триптофана, как и в отношении всех восьми незаменимых аминокислот. Можно добавить, что дети являются ауксотрофами в отношении еще двух аминокислот – аргинина и гистидина. Интересен факт отсутствия у детей способности синтезировать аргинин, снижение уровня которого у взрослых является одним из механизмов иммуносупрессорной функции КСМП. Уровень Три в организме определяется, прежде всего, уровнем поступления его извне с продуктами питания. Источником Три являются также бактерии в толстом кишечнике, продуцирующие данную аминокислоту. Во-вторых, Три необходим для образования белков, пролиферации клеток, включая, конечно, и клетки иммунной системы, которые характеризуются активной пролиферацией. Таким образом, любое снижение уровня Три в организме будет сказываться на показателях функций клеток его различных гомеостатических системах. Предполагается, что в жидкостных составляющих организма Три находится как в свободном состоянии, так и в связанной форме, например с альбумином [66]. Пока еще не ясно, какие механизмы определяют взаимоотношения между свободным и связанным Три, какова их роль в определении концентрации Три при тех или иных условиях.

Иммунодепрессивные эффекты триптофана и продуктов его катаболизма

Что касается конечных продуктов катаболизма Три, то ими являются такие биологически важнейшие молекулы, как серотонин, который, в свою очередь, является предшественником мелатонина, и как ниацин (витамин В₃), имеющий отношение к процессам метилирования ДНК. Первым и основным иммунодепрессивным катаболитом Три является кинуренин. В свою оче-

редь, последний также подвергается процессу катаболизма с помощью целого ряда последовательно действующих ферментов с образованием промежуточных катаболитов, обладающих как иммуносупрессивными, так и иммуностимулирующими свойствами [49].

Выше уже говорилось о том, что основным продуцентом IDO являются ДК. В то же время показано, что КСМП также могут экспрессировать IDO, оказывая иммуносупрессивное действие через прямой контакт с активированными Т-клетками [92]. Одним из условий формирования популяции регуляторных ДК является, по-видимому, снижение уровня Три в околкеклеточной среде. Последнее индуцирует увеличение активности фермента GCN2 (general control nondepressing 2 kinase), что инициирует активность сигнальных путей для компенсаторной адаптации клетки. По крайней мере это описано для CD19⁺ ДК у мышей. Обнаружено, что культивирование ДК человека моноцитарного происхождения в условиях сниженного содержания в среде Три обуславливает резкое увеличение способности ДК индуцировать накопление Treg. Показано, что данное увеличение регуляторной активности ДК связано с возросшей экспрессией в них ингибиторных рецепторов ILT3 и ILT4 (specific Ig-like transcripts), но остается неизменной их способность поддержания пролиферации Т-лимфоцитов при добавлении кинуренина и других продуктов катаболизма Три [79]. При популяционной оценке супрессорная активность Treg, индуцированных ДК в условиях триптофанового голода, была гораздо выше, чем у Treg, индуцированных ДК в условиях нормального содержания Три [9]. По-видимому, эти данные следует учитывать при работе с ДК в условиях *in vitro*, полученными от пациентов со сниженным уровнем Три в организме при различных патологиях.

Представляется важным подчеркнуть, что иммуносупрессивный дуплет из IDO и Три обуславливает накопление регуляторных Т-клеток из CD4⁺CD25⁺Т-клеток через активацию GCN2 киназного механизма с последующим увеличением экспрессии FoxP3 протеина. Этот процесс протекает без участия в нем наивных Treg и независимо от них. Хотя не исключено, что именно наивные Treg индуцируют экспрессию IDO в ДК, запуская механизм накопления новых Treg, препятствующих развитию аутоиммунной патологии [18].

Уже начальные этапы активации IDO в ДК сопровождаются индукцией анергии в Т-клетках с увеличением апоптотической их гибели, подавлением пролиферации Т-клеток, что связывают с уменьшением уровня Три в околкеклеточном пространстве и накоплением регуляторных Treg с усилением их супрессорной активности, связанным с активностью метаболита триптофана

кинуренном. В сравнительном аспекте, эти изменения в Т-клетках индуцируются дозой кинуренина в 10 раз меньшей, чем в ДК [73]. Что касается апоптоза при снижении уровня триптофана с участием кинуренина, то, по-видимому, процесс индуцируется Fas-независимым образом, с активацией каспазного механизма, при этом в основном, по неясным причинам, в Th1-клетках, но не в Th2. Апоптозу подвергаются как незрелые Т-клетки, так и активированные, а в его индукции активное участие принимают ДК, активированные $IFN\gamma$ [15]. Косвенно, при определенных ситуациях, преимущественный апоптоз Th1-клеток может вносить позитивный терапевтический вклад в развитие аутоиммунных заболеваний, например РА, где Th1 вместе с Th17 являются ведущим звеном патогенеза, но значительный негативный вклад в течение онкозаболеваний, где подавленная активность Th1 определяет выраженность недостаточного противоопухолевого иммунитета. Необходимо подчеркнуть, что апоптоз аутореактивных лимфоцитов, индуцированный ДК, экспрессирующими IDO, является критическим способом поддержать в норме иммунную толерантность на периферии. Следует обратить внимание на то, что $IFN\gamma$, являясь цитокином Th1-типа и наиболее сильным индуктором IDO в различных клетках (ДК, КСМП, СМК, фибробласты и др.), обеспечивает формирование негативных механизмов обратной связи в отношении активности Th1-клеток, обуславливая повышенный апоптоз последних. Что касается отношений между IDO и Th2, то здесь имеются данные о некой резистентности Th2-клеток к апоптозу из-за «триптофанового голода», резистентности к продуктам катаболизма триптофана. Более того, предполагается, что экспрессия IDO на низком уровне поддерживает функционирование этой субпопуляции Т-клеток. Однако данные достаточно противоречивы, чтобы окончательно судить о роли IDO в механизмах регуляции функции Th2-клеток. Трактовка *in vivo* данных затрудняется еще и тем, что Treg подавляют активность как Th1-, так и Th2-клеток, хотя первые все же более чувствительны к результатам экспрессии IDO, чем вторые, и за счет этого может казаться, что клетки Th2 меньше подвержены влиянию [86]. Если учесть, что одним из механизмов супрессивного действия Treg является их значительная потребность в IL-2 для пролиферации в ущерб другим субпопуляциям Т-клеток, то, возможно, клетки Th1 в большей степени страдают от нехватки цитокина, чем Th2. Наряду с индукцией апоптоза эффекторных Т-клеток, триптофанный голод вместе с Кин обуславливают уменьшение цитотоксической активности $CD8^+$ клеток у мышей, вероятно, связанной с подавлением ζ -цепи Т-клеточного рецептора [17].

В принципе апоптоз должен бы приводить к индукции аутоиммунного процесса. Однако в норме это не происходит, т. к. макрофаги, фагоцитирующие апоптотические клетки, продуцируют IDO, которая и ингибирует возможность развития аутоиммунного процесса [61]. Несомненно, что нарушение процесса фагоцитирования апоптотических клеток макрофагами в целом будет вносить свой вклад в патогенез аутоиммунных процессов с фоновым нарушением иммунной толерантности.

Клеточные механизмы защиты от триптофанового «голода»

Наличие негативного влияния катаболизма Три на активность эффекторных Т-клеток, по-видимому, не должно сказываться на активности клеток, экспрессирующих IDO, ибо если бы активность последних снижалась в условиях падения уровня триптофана, тогда затем следовало бы относительное повышение уровня триптофана с последующим возрастанием активности Т-клеток. Однако этого не происходит в силу того, что индуцируя экспрессию IDO, например в ДК, $IFN\gamma$ индуцирует образование в этих же клетках транспортера, специфического для триптофана, и только. В индукции транспортера принимает участие кинуренин через взаимодействие с AhR [7]. Получается, что, с одной стороны, клетки, экспрессирующие IDO, сами не страдают от триптофанового голодания, но с другой — при этом усугубляется негативное действие на Т-клетки в силу возрастания уровня снижения триптофана в окооклеточном пространстве за счет возрастающего поступления триптофана в эти «не голодающие» клетки. Интересно, что продолжительная экспрессия IDO в ДК не зависит от индуцирующего действия экзогенного или аутокринного $IFN\gamma$ и $TNF\alpha$, но связана с экспрессией AhR, индуцированными $IFN\gamma$, и действием на них продукта катаболизма триптофана кинуренина [34]. Следовательно, $IFN\gamma$ запускает механизмы экспрессии IDO, а кинуренин, как продукт ферментной активности IDO, поддерживает пролонгированную его активность через дополнительные механизмы (экспрессия AhR), также индуцированные $IFN\gamma$. В стабилизации регуляторных свойств пДК принимает участие TGF- β , в присутствии которого Fun опосредованное фосфорилирование IDO активирует ряд сигнальных путей, включая SHPs и неканонический (противовоспалительный) NF- κ B-путь для дальнейшего продолжения продукции TGF- β и IFN I-го типа и пролонгированием регуляторной функции пДК [20].

В организме существует и другой механизм противодействия триптофановому голоду и, прежде всего, в клетках, продуцирующих IDO. Тот же $IFN\gamma$, который индуцирует в клетках экспрессию IDO, индуцирует экспрессию фермента

tryptophanyl-tRNA-synthetase (TTS), ответственного за ассоциацию триптофана со специфической tRNA. Данный комплекс играет роль своеобразного «запасного резервуара» триптофана, что делает клетку защищенной от недостатка триптофана в околкеклеточном пространстве. Данные свидетельствуют о большей чувствительности CD4⁺T-клеток к триптофановому голоду по сравнению с CD8⁺ клетками [8].

Молекулярно-клеточные механизмы регуляции активности IDO

Необходимо подчеркнуть, что в индукции дифференцировки CD4⁺T-клеток в Treg принимают участие самые разные клеточные популяции, экспрессирующие IDO, включая плазматоидные и миелоидные ДК [12, 37] и те же фибробласты кожи. Очевидно, что при участии IDO индуцируются как CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg, так и Tr1-регуляторные клетки, продуцирующие IL-10. Последние образуются под влиянием пДК, экспрессирующих IFN α , TNF α , IL-6 при участии молекул ICOS-L (inducible costimulator ligand) [45]. Падение уровня Три в коже, например, способствует подавлению пролиферации внутриклеточных бактерий и паразитов [13]. В свою очередь, индуцированные с помощью IDO клетки Treg мышей сами способствуют индукции IDO в ДК через взаимодействие CTLA-4 на Treg с лигандами CD80/CD86 на ДК, блокируя взаимодействие с последними CD28 на Т-клетках. Кроме того, активированные Treg могут индуцировать экспрессию IDO в ДК и другими механизмами, в частности с помощью продуцированных ими IFN γ и IL-10. Первый из них индуцирует экспрессию IDO, а второй пролонгирует механизмы экспрессии [16]. Описан и другой возможный механизм индукции фермента регуляторными Т-клетками. Оказалось, что CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg мышей, не отвечающих к инъекциям staphylococcal enterotoxin B, характеризовались способностью индуцировать экспрессию IDO в ДК с помощью экспрессированной на Treg молекулы CD152. Причем этот механизм не зависел от действия IFN γ [21].

Одним из механизмов подавления экспрессии IDO с последующим уменьшением катаболизма триптофана, индуцированного IFN γ , может быть действие IL-6. Показано, что у мышей IL-6 отменяет эффект IFN γ на индукцию экспрессии IDO в CD8a⁺ лимфоидных ДК с последующим снижением уровня апоптоза в Т-клетках. Предполагается, что отмена толерогенной, иммуносупрессорной активности CD8a⁺ ДК на фоне увеличения экспрессии на них CD40 также опосредуется продуцированным эндогенно IL-6. Возможно, это связано с подавлением экспрессии в ДК рецепторов к IFN γ [23]. По всей вероятности, действие IL-6 связано с активностью SOCS3 (suppressor of cytokine signaling protein). Данные свидетельствуют,

что SOCS белки являются основополагающими регуляторами иммунного ответа. Наличие этих белков в клетке с их активностью определяет посттрансляционную, протеасомальную деградацию внутриклеточных белков, включая IDO в ДК [48]. Сам процесс протеасомальной деградации белков внутри клетки является центральным в регуляции многих важнейших биологических процессов, включая прогрессию клеточного цикла, апоптоз, репарацию ДНК [47]. Показано, что иммуногенная или толерогенная активности пДК связаны с уровнем SOCS3, когда снижение уровня обуславливает иммуногенную активность, а повышение — толерогенную. Провоспалительный эффект IL-6 и связан с его стимулирующим действием на уровень данного белка [48]. Поиск препаратов, влияющих на внутриклеточный уровень SOCS3 белка, может лечь в основу нового направления в проблеме иммунотерапии многих и многих заболеваний. По крайней мере показано, что специфический ингибитор протеасомы MG132 обуславливает трансформацию иммуногенной активности CD8⁺ ДК мышей в толерогенную, а ингибитор IDO 1-МТ ретрансформирует иммуногенную активность ДК [50]. Сделаны попытки использовать данные ингибиторы в лечении аутоиммунных заболеваний [5]. Повышение продукции IL-6 может быть обусловлено простым контактом CD28 на активированных Т-клетках с CD80/CD86 на ДК [8]. Можно себе представить, что данный механизм обуславливает снижение супрессорной активности Treg при аутоиммунной патологии, например при РА, при котором определяется повышенная продукция IL-6, также как и у мышей B6. ТС генотипа с аутоиммунным волчаночным нефритом и уменьшенным содержанием Treg со сниженной супрессорной активностью [82]. Следует отметить, что повышение уровня IL-6 в данных исследованиях отмечается на фоне увеличения экспрессии IDO, который обуславливает подавление продукции данного цитокина [3] в тех же самых пДК. Отсюда — либо существуют какие-то количественные взаимоотношения между уровнем экспрессии IDO и его способностью подавлять продукцию IL-6, либо в ходе развития аутоиммунного процесса формируются механизмы резистентности экспрессии гена IL-6 к ингибирующему эффекту IDO.

Тандем IDO—триптофан в патогенезе социально значимых заболеваний

Инфекции

Данные литературы однозначно свидетельствуют об активном участии в патогенезе таких вирусных инфекций, как ВИЧ, грипп, повышение экспрессии IDO в ДК с последующим негативным влиянием на уровень триптофана, на противовирусную активность Т-клеток и, в случае с ВИЧ-инфекцией, с остановкой CD4⁺

в G1/S фазе и снижением экспрессии на CD8⁺ костимулирующего рецептора CD28. При этом в роли индуктора IDO при обеих инфекциях выступает IFN γ , в случае ВИЧ-инфекции в индукции фермента участвует также и Tat-вирусный белок (N-terminal domain of HIV-1 transactivator regulatory protein) [67].

Выясняется, что иммуносупрессивные механизмы, обусловленные увеличением индукции IDO и катаболизма триптофана, принимают активное участие в патогенезе инфекцией, вызванных вирусом Эпштейна–Барр, вирусом папилломы человека, вирусами гепатита В и С. При хроническом гепатите С регистрируется повышенная активность IDO, которая коррелирует со степенью воспаления и фиброза в печени, а ДК от таких больных индуцировали больше Treg по сравнению с донорами [25]. Интересно, что моноциты от больных, инфицированных вирусом гепатита С, дифференцировались в IDO⁺ ДК с более выраженной способностью индуцировать накопление Treg при стимуляции ЛПС или IFN γ по сравнению с моноцитами доноров [33]. Возможно, что уже на этом этапе инфекции в организме идет «подготовка» для увеличения экспрессии IDO и катаболизма триптофана с целью торможения репликации вируса. Предполагается, что сначала возрастает экспрессия IDO в клетках под влиянием IFN γ и только после этого отмечается снижение репликации вирусов С и В [25, 39].

В отношении роли «дуплета» IDO/триптофан в патогенезе туберкулеза имеются, по-видимому, пока еще противоречивые данные. Имеются данные как о повышении экспрессии IDO у больных туберкулезом, так и об отсутствии его влияния на течение заболевания [67]. По всей вероятности, данный дуплет имеет отношение к формированию туберкулезной гранулемы, где повышенная экспрессия IDO фиксируется и в центре гранулемы, и в окружающих структурах, в таких клетках, как CD68⁺ макрофаги и CD11c⁺S100⁺ дендритные клетки. При этом вокруг гранулемы возрастает численность Treg на фоне снижения уровня триптофана [57, 79]. С одной стороны, эти результаты трактуются авторами с точки зрения механизмов ограничения распространения микроорганизмов. Но с другой стороны, несомненно участие этих механизмов в подавлении функций эффекторных иммунокомпетентных клеток, что способствует «избеганию» микроорганизмов от иммунной системы. Получается, что снижение уровня триптофана как бы «палка о двух концах». Понижая уровень триптофана, макроорганизм старается не дать возможность активно размножаться микроорганизму. Последнему триптофан тоже необходим для жизнедеятельности последнего. По-видимому, эволюционно это самая примитивная, защитная, если хотите, иммунная

реакция макроорганизма на вторжение «иноземца». Но при этом «триптофановый голод» одновременно оказывает негативный эффект на активность иммунокомпетентных клеток, и тогда ее может не хватить для формирования специфического иммунного ответа достаточной силы, чтобы не позволить микроорганизму индуцировать развитие патологического процесса.

Сепсис

Имеющиеся литературные данные свидетельствуют о теснейшей зависимости клинической картины при сепсисе различного генеза и уровня активности IDO. Описано увеличение отношения кинуренин/триптофан как прогностический маркер выраженности течения и смертности при community-acquired pneumonia [74]. Увеличение активности IDO также оценивается как предиктор выраженности и смертности при сепсисе, а повышенная пропорция кинуренин/триптофан при сепсисе коррелирует с повышенным уровнем IFN γ и IL-10, которые участвуют в пролонгации индукции IDO, способствуя снижению у больных количества CD4⁺ и CD8⁺T-клеток. Главным источником IDO при сепсисе, по-видимому, являются CD14⁺ моноциты, стимуляция *ex vivo* которых IFN γ приводила к экспрессии IDO, что не зависело от сигналов через NF- κ B-путь [14, 75].

Значительно повышен уровень катаболизма Три при сосудистых заболеваниях сердца, который коррелирует с активностью заболевания и уровнем неоптерина. Последний, так же как и IDO, является продуктом деятельности IFN γ [84]. Отношение Кин/Три обнаружило предиктивные значения при кардиоваскулярной смертности у пациентов со стабильным заболеванием коронарной артерии [53]. Уровень катаболитов Кин был повышен у пациентов со стабильной стенокардией и был предиктором риска развития острого инфаркта миокарда [54].

Аутоиммунная патология

По-видимому, все заболевания аутоиммунной природы, с точки зрения иммунопатогенеза, следует рассматривать как состояния нарушенной толерантности к собственным антигенам. Несомненно участие в срыве толерантности механизмов, связанных с экспрессией IDO и катаболизмом триптофана. В этом отношении данные свидетельствуют о снижении количества клеток, экспрессирующих IDO, в основном ДК, на периферии у пациентов с РА и СКВ [22]. Описано значимое увеличение отношения Кин/Три при РА. При этом снижение концентрации триптофана ассоциировалось с прогрессивной стадией заболевания, но не с активностью, со степенью которой лучше коррелировали показатели СРБ и СОЕ [69]. Авторы предполагают, что супрессивных механизмов, индуцированных катаболизмом Три, не достаточно, чтобы полностью заингибировать аутоиммунный про-

цесс при том же РА. Было показано при экспериментальном артрите у мышей, что экспрессия IDO и ферментов, участвующих в катаболизме Кин (kynurenine 3-monoxygenase, kynureninase, 3-hydroxyanthranilate 3,4 dioxygenase), возрастала в период индукции патологии, а экспрессия последних ферментов снижалась в фазе разрешения процесса. Данные, несомненно, свидетельствуют об активном участии «дуэта» IDO-Три в патогенезе аутоиммунной патологии [85]. Не безынтересно, что инвазия микроорганизмами клеток, экспрессирующих IDO, может подавлять экспрессию фермента, внося вклад в патогенез аутоиммунных заболеваний снижением выраженности супрессорных механизмов [15].

При СКВ отмечается увеличение активности IDO на фоне снижения содержания в сыворотке Три и серотонина, для которого Три является молекулой предшественником. Предполагается, что индуктором активации экспрессии IDO является $IFN\alpha$, продуцируемого пДК после взаимодействия TLR-7 и TLR-9 с иммунными комплексами, содержащими нуклеиновые кислоты [36].

При рассеянном склерозе, при обострении заболевания отмечается повышение экспрессии в клетках IDO и увеличение уровня неоптерина в сыворотке на фоне снижения экспрессии $IFN\gamma$. Возможно, последнее связано с ингибирующим эффектом IL-17. Было обнаружено, что пик экспрессии $IFN\gamma$ падает на начало обострения заболевания. Авторы считают, что увеличение активности Treg в ремиссии рассеянного склероза связано с увеличением экспрессии IDO [38].

Считается, что развитие диабета 1 типа у диабетических мышей линии NOD является результатом дефекта механизмов периферийной и центральной толерантности. Полученные данные свидетельствуют о дефективных ДК у самок этих мышей, т. к. $IFN\gamma$ практически не индуцировал супрессивные или толерогенные свойства у $CD8^+$ ДК, в отличие от самцов той же линии, в преддиабетический период. В этих же ДК и экспрессия белка IDO, и его функция были снижены. Предполагается, что в основе найденных изменений экспрессии IDO в ДК под влиянием $IFN\gamma$ лежат нарушения механизмов нитрации тирозина фактора Stat1 пероксинитритом, высоко реактивным оксидантом, продуцированным комбинацией свободных радикалов, супероксида и NO [24]. $IFN\gamma$ не индуцировал экспрессию IDO не только в пДК мышей NOD, но и в фибробластах кожи, также, возможно, вследствие дефекта фосфорилирования Stat1 фактора [29]. Показано, что TGF- β индуцирует фосфорилирование IDO1 в пДК, что обуславливает пролонгацию экспрессии IDO1 и супрессорную функцию ДК. Здесь IDO1 выполняет не просто энзиматические функции, а функционирует как сигнальная молекула, подобно факторам транскрипции, для поддержания

регуляторной роли пДК. Оказалось, что TGF- β не индуцирует IDO-зависимую иммуносупрессорную активность пДК у NOD мышей, по видимому, из-за исходно низкого уровня содержания IDO в этих клетках, т. к. предварительное повышение уровня IDO в пДК мышей данного генотипа способствует появлению ответности ДК к действию TGF- β . Интересно, что ДК мышцей NOD продуцируют значительно больше IL-6 и $IFN\alpha$ [52]. Вполне вероятно, что повышенный уровень IL-6 и является одним из механизмов снижения супрессорной активности ДК. Показано, что данный цитокин ингибирует толерогенную функцию $CD8\alpha^+$ ДК, экспрессирующих IDO [23]. Не исключено, что IL-6 участвует и еще в одном механизме формирования аутоиммунного процесса, т. к. он вместе с TGF- β способствует трансформации Treg в Th17-клетки, играющие ведущую роль в процессе формирования аутоиммунной патологии. Показан ингибирующий эффект IL-6 на экспрессию гена FoxP3 в Treg через STAT3 механизм [90]. При этом для фенотипической конверсии Treg в Th17 не требуется деления клетки. Не безынтересно отметить, что цитокин TGF- β необходим как для поддержания активности Treg, так и для их конверсии в Th17-клетки [60].

Следовательно, в организме NOD мышей формируется как бы комплексная нехватка IDO, что и способствует развитию у них аутоиммунной патологии. О возможном участии фибробластов в супрессорных механизмах, что, несомненно, надо иметь в виду, свидетельствуют данные о способности фибробластов кожи мышей экспрессировать IDO после стимуляции $IFN\gamma$ и поддерживать рост Treg в условиях культивирования *in vitro*, и не просто регуляторных клеток, а антиген-специфических Treg [13]. В принципе, именно фибробласты кожи могут стать терапевтическим препаратом для оказания супрессивного эффекта для лечения, например, аутоиммунных заболеваний при трансплантации после индукции экспрессии в них IDO с помощью $IFN\gamma$.

Способность фибробластов экспрессировать IDO имеет непосредственное отношение и к патологии. Показано, что синовиальные фибробласты от больных РА на высоком уровне экспрессируют IDO, с чем связывают их ингибирующее влияние на пролиферацию Т-клеток из периферической крови больных РА и здоровых доноров [65]. И в то же время показано, что эффекторные Т-клетки в синовиальной жидкости гораздо менее чувствительны к триптофановому голоду в силу повышенного уровня в них фермента TTS, обуславливающего достаточный уровень внутриклеточного Три. При этом такие провоспалительные цитокины, как $IFN\gamma$ и $IFN\alpha$, поддерживают экспрессию TTS на высоком уровне, а моАТ к этим цитокинам ингибировали их эф-

фект на TTS, после чего Т-клетки становились чувствительными к триптофановому голоду [91]. Кстати, $IFN\gamma$ индуцирует фермент TTS и в фибробластах, что делает их также нечувствительными к триптофановому голоду [63]. В принципе, следует подумать об моАт против TTS как о лекарственном препарате для лечения аутоиммунных заболеваний.

Учитывая срыв иммунологической толерантности как основной механизм развития аутоиммунных заболеваний, естественно, следует разрабатывать способы индукции супрессорных клеток. Так, описан положительный клинический эффект введения метаболитов триптофана (N-(3,4,-dimethoxycinnamoy anthranlic acid)), индуцирующих накопление Treg, при аутоиммунном энцефаломиелите у мышей с подавлением пролиферации миелин-специфических Т-клеток и снижением накопления Th1-клеток [56]. Интересно, что Treg могут подавлять развитие аутоиммунного диабета при адаптивном переносе мышам NOD-SCID. Однако оказалось, что данный супрессивный механизм индуцированных Treg реализовался на фоне повышенного катаболизма триптофана, ибо ингибитор IDO отменял супрессорную активность переносимых Treg [18]. Имеются данные, свидетельствующие о том, что у мышей Treg, экспрессирующие CD25 на высоком уровне, индуцируют продукцию IDO в пДК через контактные механизмы путем взаимодействия CTLA-4 молекул на Treg с B7 на ДК. В то же время Treg с низкой экспрессией CD25 индуцируют продукцию IDO в ДК с помощью продуцированного IL-10 [16]. Авторы предполагают, что первые принимают участие в формировании иммунной толерантности к аутоантигенам, а вторые – в ограничении иммунного ответа к чужеродным антигенам.

Трансплантация органов

Не обходится без участия IDO и проблема пересадки органов и тканей. В опытах на мышах показано, что время отторжения аллогенных органов значительно пролонгируется в условиях повышенной активности IDO, в частности с помощью одновременной трансплантации органа и ДК донора, продуцирующих IDO, или с помощью $IFN\gamma$, введенного сразу же после трансплантации клеток костного мозга. В последнем случае тормозилось развитие РТПХ [10].

В то же время у человека повышенная экспрессия IDO является надежным признаком острого отторжения аллогенного сердца при отсутствии четких данных о влиянии на продолжительность приживания [73]. В условиях трансплантации аллогенного костного мозга повышенная активность IDO, повышенный уровень $IFN\gamma$ в сыворотке и увеличенная пропорция Киц/Три носят характер информативного признака РТПХ. При лечении РТПХ глюкокортикоидами активность

IDO снижалась [88]. Предполагается, что найденные изменения являются результатом активации клеток Th1, продуцирующих $IFN\gamma$ со всеми вытекающими отсюда последствиями. Можно думать, что в данных условиях опаздывает процесс накопления Treg, которые могли бы подавить активность клеток эффекторов РТПХ.

Онкологические заболевания

В литературе накапливается достаточно большой материал об эффективности различных иммунотерапевтических воздействий в онкологии. Однако, к сожалению, как правило, они действуют далеко не в 100% случаев. Скорее всего, это может быть связано с действием многочисленных иммуносупрессивных факторов, среди которых одно из ведущих мест занимает IDO, где только снижение уровня триптофана в клеточном окружении уже является первым толчком к снижению активности эффекторных иммунокомпетентных клеток. Впоследствии к этому механизму присоединяются иммуносупрессивные механизмы различных продуктов катаболизма триптофана, включая кинуренин. Показано, что последний принимает участие в индукции Treg, которые стимулируют экспрессию IDO в клетках иммунной системы.

Многочисленные литературные данные свидетельствуют об экспрессии функционально активного белка IDO в самых различных опухолях гематологического происхождения (моноцитарная лейкемия, острая лимфоцитарная лейкемия, острая миелоидная лейкемия, Т-клеточная лимфома) и в солидных опухолях (рак груди, рак головы и шеи, немелкоклеточный рак легких, рак прямой кишки, эндометриальный рак, рак желудка, глиобластома, мелкоклеточный рак легких, меланома, мезотелиома, рак поджелудочной железы) [42]. При этом при многих опухолевых процессах прослеживается взаимосвязь между уровнем экспрессии в опухоли IDO и сниженной инфильтрации Т-клетками, прогрессией заболевания укорочением времени продолжительности жизни [42].

При ряде опухолей определяется экспрессия IDO в различных клетках. У больных с меланомой, например, она была найдена в пДК и моноцитарных КСМП (клетки супрессоры миелоидного происхождения). В последних экспрессия IDO была выше у больных с более тяжелым течением заболевания. У этих же больных экспрессия IDO определяется также в клетках регионарных лимфатических узлах, что, по мнению авторов, свидетельствует о системном участии фермента в формировании иммуносупрессивного состояния при меланоме. Предполагается участие $IFN\gamma$ в индукции экспрессии IDO в иммунокомпетентных клетках и участие полиморфизма генов $IFN\gamma$ и IDO в определении уровня катаболизма триптофана [11].

Экспрессия IDO опухолевыми клетками обуславливает миграцию в опухоль клеток супрессоров миелоидного происхождения (КСМП), как это было показано в экспериментах на мышцах при трансплантации реципиентам клеток опухоли B16-IDO меланомы человека. Причем, выраженную супрессорную активность эти клетки приобретали в самой опухоли, т. к. клетки этого фенотипа CD11b⁺Gr1^{int} из селезенки не обладали иммуносупрессорной активностью в условиях *in vitro*. Интересно, что КСМП из B16-IDO опухоли принадлежали в основном к фенотипу моноцитарного, но не гранулоцитарного происхождения CD11b⁺Gr1^{high}. Авторы приводят доказательства, что Treg, расположенные в опухоли и в индукции которых также принимает участие IDO, несут ответственность за миграцию в нее КСМП моноцитарного фенотипа [27]. Остается не ясным, почему Treg предпочитают взаимодействовать с КСМП моноцитарного фенотипа, но не гранулоцитарного. Возможно, имеются различия в количестве лигандных молекул на поверхности КСМП, взаимодействующие с молекулами на Treg типа CTLA-4 и/или PD1. Интересно, что моноцитарные КСМП обладают более выраженным супрессивным эффектом в отношении пролиферации CD8⁺ клеток, по сравнению с гранулоцитарными. Первые реализуют супрессию через экспрессию NO синтазы 2 (NOS2) и аргиназы 1, через продукцию реактивных нитогенных молекул, а вторые – через ROS-опосредованные механизмы [43].

В определенных ситуациях, в экспериментах на мышцах NOD.H2h4 с аутоиммунным тиреоидитом ускорение развития патологии было связано с увеличением экспрессии IDO в клетках. Авторами это трактуется как возможное компенсаторное увеличение иммуносупрессивных механизмов с целью подавления нарастающей активности клеток эффекторов [70].

Учитывая последние данные, можно было бы ожидать, что иммунотерапия опухоли (в частности, меланомы у мышей) с помощью антител против CTLA-4, эффективность которой далека от 100%, будет протекать более интенсивно на фоне снижения экспрессии IDO. При этом регистрировалось снижение содержания в опухоли Treg. Однако оказалось, что данная терапия сопровождалась увеличением уровня экспрессии данного фермента, возможно, вследствие действия других факторов, обуславливающих как усиление активности противоопухолевых лимфоцитов, так и увеличение экспрессии IDO. В роли такого фактора может выступать тот же IFN γ , эффект которого проявляется в обоих направлениях. Однако, когда анти-CTLA-4 иммунотерапию проводили в кооперации с ингибитором экспрессии IDO 1-МТ (1-methyl-tryptophan), то противоопухолевый эффект

комбинированного воздействия, который проявлялся увеличением инфильтрации опухоли активными CD8⁺ и CD4⁺ лимфоцитами, значительно превышал эффект монотерапии антителами [26]. Именно с точки зрения негативного участия IDO в процессе авторы трактуют резистентность к терапии антителами.

Более интенсивный противоиммуносупрессивный эффект отмечался у мышей с опухолью B16-IDO при комплексном использовании ингибитора IDO IDOi (indoximod/D-MT) и блокатора CSF1R (colony stimulating factor-1) PLX647, по сравнению с действием отдельно взятых препаратов. Здесь применение блокатора CSF-1 рецептора базировалось на данных об иммуносупрессивной функции КСМП (клеток супрессоров миелоидного происхождения), которая усиливается при действии на КСМП данного фактора роста. Авторы подчеркивают, что целесообразность такого комплексного использования препаратов должно базироваться на предварительной оценке продукции клетками опухоли IDO и наличия в ней КСМП, продуцирующих и IDO) и экспрессирующих CSF-1R [28].

Помимо участия в создании иммуносупрессивной обстановки внутри опухоли IDO, которая способствует «убеганию» клеток опухоли от иммунного надзора, экспрессируемая опухолевыми клетками IDO обуславливает еще и резистентность опухолевых клеток к противоопухолевым препаратам. Это положение находит подтверждение в исследованиях, где экспрессия IDO в клетках опухоли яичников коррелировала с резистентностью опухоли к paclitaxel. Совместное применение paclitaxel с ингибитором IDO 1-methyl-DL-tryptophan (1-МТ) в большей степени способствовало регрессии опухоли, по сравнению с одним paclitaxel. Подобного рода результаты были получены и при совместном использовании ингибитора IDO и cisplatin [46]. Здесь ясно просматривается цепочка формирования целой сети иммуносупрессивных факторов: опухоль продуцирует IDO (уже один иммуносупрессивный фактор), что обуславливает повышенную миграцию в опухоль КСМП, которые продуцируют целый ряд молекул с иммуносупрессивными свойствами, включая аргиназу-1 и IDO. Повышение уровня экспрессии IDO связано с индукцией накопления Treg и усилением их супрессорной активности. А выше уже говорилось о возможности Treg через CTLA-4 стимулировать экспрессию IDO в ДК.

Показано, что мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые могут дифференцироваться в остеобласты, хондробласты, миоциты и адипоциты, в интактном состоянии не экспрессируют IDO. Эти клетки экспрессируют IDO после стимуляции провоспалительными цитокинами IFN γ и TNF α в комбинации с

IL-1 β [72]. В этом, по-видимому, заключается противовоспалительная функция МСК, направленная на подавление местных воспалительных реакций, на оптимизацию иммунного гомеостаза на фоне формирования оптимальных соотношений между провоспалительным и противовоспалительным фенотипами с целью модулирования врожденного иммунного ответа *in vitro* и *in vivo* [6]. Супрессивную активность в МСК индуцируют также такие цитокины, как IL-10 и IFN β через активацию STAT1 сигнального пути, продуцируемые, в частности, клетками T γ 1. Показано, что введение одних МСК мышам с индуцированным коллагеном артритом не влияет на течение заболевания, а инъекция МСК совместно с T γ 1 оказывало значительный терапевтический эффект за счет индукции в МСК экспрессии IDO. Этими же авторами было показано, что T γ 1 обладают большей стабильностью и функциональной активностью в процессе развития аутоиммунных реакций, по сравнению с T γ reg [35]. При введении МСК в участок трансплантата аорты у свиней наблюдалось развитие толерантности к трансплантату на фоне увеличения экспрессии IL-10, IFN γ и IDO при неизменной экспрессии FoxP3. По мнению авторов, в индукции толерантности к трансплантату в данных экспериментах принимают участие клетки, подобные T γ 1 [32]. Создается впечатление, что клетки различного генеза с супрессорной активностью все время взаимодействуют друг с другом, поддерживая активность у партнера: МСК с помощью IDO индуцируют накопление T γ 1 подобных клеток, а те, с помощью синтезированного IFN γ (этим они отличаются от истинных T γ 1, продуцирующих IL-10 и TGF- β), стимулируют активность МСК. Показано, что в индукции T γ 1 подобных клеток принимает участие не только IDO, но и ПГЕ $_2$, продуцируемый теми же клетками. Блокада обоих медиаторов супрессии, а не каждого в отдельности, в МСК практически полностью отменяла их супрессорную активность в аллостимулированном иммунном ответе [30].

Биосинтез IDO и кинурениновый путь катаболизма триптофана имеют непосредственной отношении к развитию нейрпатологии. Например, при развитии экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита у мышей экспрессия IDO в микроглии, индуцированная IFN γ из Th1-клеток, направлена на подавление воспалительной реакции. Но в то же время, продвинутое катаболизму триптофана такие как QUIN (quinolinic acid) и 3-НАА (3-hydroxyanthranilic acid) обладают выраженным нейротоксическим эффектом, который лежит в основе развития таких заболеваний, как болезни Альцгеймера, Хантингтона, развития депрессивных состояний при различных воспалительных заболеваниях, включая ВИЧ-инфекцию, где регистрируется

формирование комплекса симптомов нарушения нейropsychических расстройств, включая деменцию [40, 64].

IDO как таргетная мишень в терапии различных заболеваний

В индукции экспрессии IDO в различных клетках принимают участие такие рецепторы, как TLR, TNFRs, IFNBR, IFNGR, TGF-bR и AhR (aryl hydrocarbon receptor). При этом оказалось, что стимуляция TLR3 и TLR4 индуцирует продукцию IDO1 в ДК, а стимуляция TLR7/8 – в моноцитах [40]. Такое разнообразие пусковых молекул, участвующих в запуске механизмов экспрессии IDO, может свидетельствовать о важности участия данных иммуносупрессивных механизмов в формировании иммунного ответа адекватного виду антигена, его дозе, возрасту отвечающего организма и состоянию характеристик его здоровья. Несомненно, что несогласованность функционирования этих пусковых молекул будет сказываться на развитии патологических состояний либо с выраженными иммуносупрессивными механизмами (рак, хронические воспалительные заболевания), либо состояний с недостаточной активностью иммуносупрессивных механизмов (аутоиммунные заболевания, атеросклероз, аллергические заболевания).

Иммунная тромбоцитопения, например, характеризуется сниженной экспрессией IDO в ДК. Обработка таких ДК CTLA-4Ig обуславливало увеличение экспрессии IDO и такие ДК активно подавляли активацию и пролиферацию Т-клеток, стимулировали апоптоз Т-клеток и индуцировали накопление T γ reg. Предполагается, что IDO играет существенную роль в патогенезе данного заболевания [87]. Не исключено, что в данном случае имеет место нарушение не ферментативной функции IDO, а ее участия в событиях внутриклеточной передачи сигналов, как это было показано в опытах с пДК мышей при обработке их TGF- β , для поддержания состояния толерогенной функции ДК [51].

Это, по-видимому, один из механизмов недостаточного участия супрессивных механизмов, индуцированных IDO в патогенезе аутоиммунных заболеваний. Можно думать, что здесь либо снижен уровень провоспалительных цитокинов, необходимых для индукции IDO, либо существуют какие-то внутриклеточные механизмы, ингибирующие экспрессию гена IDO.

В настоящее время клинические испытания проходят несколько ингибиторов IDO: INCB024360, indoximod (D-1MT), IDO peptide vaccine, NLG919. Предварительные результаты свидетельствуют о достаточно выраженной клинической эффективности данных препаратов при ряде опухолей при использовании в виде монотерапии. Однако все больше и больше накапливается данных о большей эффективности

сочетанного использования ингибиторов IDO с другими ингибиторами опухолевого роста. Успешно проходят клинические испытания комплекс INCB024360 с ipilimumab (анти-CTLA-4 Ат), INCB024360 с MK3475 (ингибитор PD-1), INCB024360 с MEL1AC 12.1 (мультипептидная меланомная вакцина), indoximod с docetaxel, indoximod с ipilimumab и др. [42].

Очевидно, необходимо ставить вопрос о клиническом использовании в онкологии иммуномодулирующих коктейлей, состоящих из препаратов против нескольких точек, ответственных за формирование иммуносупрессивных условий в организме, способствующих росту опухоли на фоне снижения активности иммунокомпетентных клеток эффекторов. По-видимому, следует признать неоспоримым фактом, что монотерапия в онкологии может иметь только такой успех, который будет носить временный эффект недостаточной силы и глубины воздействия.

Несомненно, следует иметь в виду, что IFN γ помимо IDO индуцирует образование в ДК неоптерина с использованием фермента GTP-cyclohydrolase, который также обладает иммуносупрессивным эффектом. Кроме того, процесс катаболизма триптофана сопровождается активацией арахидоновой кислоты с последующим образованием тех же простагландинов, также оказывающих негативное влияние на активность иммунокомпетентных клеток. В какой степени один ингибитор IDO будет влиять на другие иммуносупрессивные механизмы, еще надо изучать... Одновременно с IDO и неоптерином IFN γ индуцирует в макрофагах образование NO (nitric oxide) с помощью NOS (nitric oxide synthase), также обладающим иммуносупрессивным эффектом, но при этом, как оказалось, он ингибирует активность IDO, обратимо связываясь с активным участком гена [78].

Имеется достаточно много исследований о положительном эффекте блокады IDO на рост опухоли. При многих опухолях блокада фермента обуславливала увеличение сроков жизни животных на фоне торможения роста опухоли. Однако нет подробных исследований зависимости эффекта ингибиции от дозы ингибитора, от кратности его введения, от сроков введения и т. д. В то же время появились работы по комбинированному воздействию на супрессорные механизмы при опухолях. При ряде опухолей совместное использование блокатора IDO 1-МТ и цитостатика temozolomide обуславливает стимуляцию противоопухолевого иммунитета, хотя один блокаторов не оказывал влияния. Не было обнаружено эффекта блокатора и на рост глиомы у мышей. Но совместное введение 1-МТ с блокаторами CTLA-4 и PD-L1 обуславливало значительное удлинение сроков жизни на фоне достижения эффекта в 100% случаев [81]. Если учесть, что IDO

обуславливает накопление Treg, а CTLA-4 и PD-L1 являются молекулами — характеристиками супрессорной активности, то можно думать, что суммарный эффект всех трех воздействий и складывается из ингибиции как накопления, так и функциональной активности Treg.

Аспирин хорошо известен как ингибитор активности фермента циклооксигеназы 2 (ЦОГ2). Оказалось, что он также в условиях *in vitro* подавляет процесс катаболизма Три, индуцируемого IDO в клетках периферической крови человека. Авторы склонны считать, что в основе данного эффекта лежит способность аспирина ингибировать продукцию IFN γ в стимулированных митогенами клетках и за счет этого влиять на экспрессию IDO [68]. Скорее всего, это не единственный возможный механизм действия аспирина, если учитывать тот факт, что ПГЕ₂ является одним из индукторов экспрессии гена IDO. Тогда следует ожидать, что снижение уровня ПГЕ₂ повлечет за собой уменьшение продукции IDO. По крайней мере способность подавлять катаболизм Три открывает новый противовоспалительный механизм аспирина как ингибитора ЦОГ2 в его обоим механизмах влияния на иммунную систему. Особенно важно учесть эти знания об аспирине в отношении его использования в терапии опухоли, где и ПГЕ₂, и IDO работают на «мельницу» иммуносупрессивных механизмов при опухолевом росте.

Если в онкологии стоит задача всеми способами попытаться «засупрессировать» супрессорные механизмы, чтобы дать возможность иммунокомпетентным клеткам-эффекторам «расправиться» с опухолевыми клетками, то в случае аутоиммунной патологии стоит противоположная задача — стимулировать разнообразные супрессорные механизмы как можно раньше и как можно сильнее. В обоих случаях это касается IDO, Три и Кин. В первом случае необходимо погасить активность IDO, чтобы катаболизм Три не дошел до образования его продуктов. Во втором случае необходимо использовать те катаболиты, которые имеют отношение к стимуляции накопления Treg. Прежде всего, это касается кинуренина, основополагающего продукта катаболизма Три. На модели экспериментального артрита показано, что терапия Кин значительно тормозит развитие клинической и гистологической прогрессии заболевания. Действуя, скорее всего, через AhR, Кин способствует дифференцировке Treg и подавляет активность Th17. Метаболит, уже кинуренина, 3-hydroxyanthranilic acid подавляет активность Th1- и Th17-клеток и тормозит развитие экспериментального энцефалита, индуцирует апоптоз в Т-клетках, практически не действуя на активность Th2-клеток [85].

Tranilast, синтетический дериват 3-hydroxyanthranilic acid, известный как антиаллерги-

ческое лекарство, при введении мышам с экспериментальным артритом обуславливал снижение клинической и гистологической выраженности заболевания на фоне снижения активности Th1-клеток и увеличения продукции IL-10, подавления продукции IFN γ и пролиферации T- и B-лимфоцитов [85]. На основе сделанного заключения о противовоспалительных и анальгетических свойствах Tranilast был рекомендован для использования в терапии РА [31].

В проблеме лечения аутоиммунных заболеваний представляется важным факт необходимости поиска препаратов, стимулирующих накопление и активность клеток-супрессоров различного генеза, включая, естественно, и Treg. Несомненно, воздействия в данном направлении должны носить комплексный характер, как это было описано для эффектов на T-супрессоры при онкологии, которые состояли из совместного применения анти-IDO, анти-CTLA-4, анти-PD-L1. В случае аутоиммунной патологии показано, например, что совместное применение IFN γ и zebularine, ингибитора метилирования ДНК, носит синергичный характер в отношении индукции экспрессии IDO [89].

Показано, что в организме существуют регуляторные механизмы, негативно влияющие на уровень продукции IDO клетками. К внутриклеточным механизмам можно отнести процесс протеосомальной деградации IDO после образования комплекса с SOCS3 (suppressor of cytokine signaling protein) [47]. Представляется весьма интересным тот факт, что в организме функционируют и внеклеточные механизмы, направленные на подавление активности IDO и связанное с последней снижение уровня Три. Несомненно, что это биологически оправданно, ибо любая активация активности фермента с последующим уменьшением содержания в тканях незаменимой аминокислоты Три могла заканчиваться катастрофой для организма, т. к. Три крайне необходим для нормального функционирования, практически всех клеток различных тканей. И иммунная система «находит» выход из критической ситуации. В ответ на повышение количества молекул фермента начинает формироваться популяция цитотоксических T-лимфоцитов, которые способны убивать как ДК, экспрессирующие IDO, так и опухолевые клетки [2]. Подобного рода клетки были обнаружены как у больных с опухо-

лями различной локализации, так и у здоровых доноров [1].

В качестве заключения

Таким образом, проблема роли IDO, неотъемлемо связанная с содержанием в организме незаменимой аминокислоты триптофана, занимает ведущие позиции в выяснении механизмов функционирования иммунной системы вообще, как таковой. Это в первую очередь касается беременности, где протекание нормальной беременности, без патологических признаков, напрямую связано с формированием иммунной толерантности к антигенам плода со стороны иммунной системы матери, зависящей в значительной степени от активности IDO в плаценте.

Следует признать, что патогенез таких социально значимых заболеваний, как рак, атеросклероз, аутоиммунные и аллергические болезни довольно тесно связан с поломом иммунной толерантности (аутоиммунная патология) или с ее формированием в случаях опухолевой патологии, обусловлен нарушениями в системе иммуносупрессорных клеток, находящихся под регуляторным контролем IDO и продуктов катаболизма триптофана. Оказалось, что депрессивные состояния, которые по прогнозам футурологов могут занять первое место среди всех заболеваний по потере трудоспособности, также во многом базируются на патологических изменениях в системе IDO—триптофан в силу участия триптофана в продукции серотонина в качестве предшественника. Все это дает основание говорить, что необходимо уделять глубочайшее внимание данной проблеме в поисках и разработке новых методов оценки функций продуктов катаболизма триптофана на всех его этапах с изучением их роли в патологическом процессе любой направленности. Представляется важным разработка новых методов терапевтического воздействия на механизмы, участвующие в процессе катаболизма триптофана. Полученные данные позволят глубже понять механизмы функционирования иммунной системы в норме, понять роль их нарушений в процессах формирования различных патологий, что будет способствовать лечению основных, социально значимых заболеваний современного человека.

Список литературы / References

1. Andersen M.H. CD4 responses against IDO. *Oncoimmunology*, 2012, Vol. 1, pp. 1211-1212.
2. Andersen M.H. Anti-regulatory T cells. *Semin. Immunopathol.*, 2016.
3. Baban B., Chandler P.R., Sharma M.D., Pinkala J., Koni P.A., Munn D.H., Mellor A.L. IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 4, pp. 2475-2483.
4. Belladonna M.L., Grohmann U., Guidetti P., Volpi C., Bianchi R., Fioretti M.C., Schwarcz R. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, pp. 130-137.

5. Bennett M.K., Kirk C.J. Development of proteasome inhibitor in oncology and autoimmune diseases. *Curr. Opin. Drug. Discov. Devel.*, 2008, Vol. 11, pp. 616-625.
6. Bernardo M.E., Fibbe W.E. Mesenchymal stromal cells: sensor and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell*, 2013, Vol. 13, pp. 392-402.
7. Bhutia Y.D., Babu E., Ganapathy V. Interferon- γ induces a tryptophan-selective amino acid transporter in human colonic epithelial cells and mouse dendritic cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2015, Vol. 1848, pp. 453-462.
8. Boasso A., Herbeval J.-P., Hardy A.W., Winker C., Shearer G.M. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophanyl-tRNA-synthetase by CTLA-4-Fc in human CD4⁺ N cells. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 4, pp. 1574-1581.
9. Brenk M., Scheler M., Koch S., Neumann J., Takikawa O., Hacker G., Bieber T., von Bubnoff D. Tryptophan deprivation induces inhibitory receptors ILT3 and ILT4 on dendritic cells favoring the induction of human CD4⁺CD25⁺Foxp3 T regulatory cells. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 1, pp. 145-154.
10. Brok H.P., Vossen J.M., Heidt P.J. IFN-gamma-mediated prevention of graft-versus-host disease: pharmacodynamic studies and influence on proliferative capacity of chimeric spleen cells. *Bone Marrow Transplant.*, 1998, Vol. 22, no. 10, pp. 1005-1010.
11. Chevolet I., Speckaert R., Schreuer M., Neyns B., Krysko O., Bachert C., Hennart B., Allorge D., van Geel N., Van Gele M., Brochez L. Characterization of the *in vivo* immune network of IDO, tryptophan metabolism, PD-L1, and CTLA-4 in circulating immune cells in melanoma. *Oncoimmunology*, 2015, Vol. 4, no. 3, doi: 10.4161/2162402X.2014.982382.
12. Chung D.J., Rossi M., Romano E., Ghith J., Yuan J., Munn D.H. and Young J.W. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing mature human monocyte-derived dendritic cells expand potent autologous regulatory T cells. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 3, pp. 555-563.
13. Curran T.A., Jalili R.B., Farrokhi A., Grahary A. IDO expressing fibroblasts promote the expression of antigen specific regulatory T cells. *Immunobiology*, 2014, Vol. 219, no. 1, pp. 17-24.
14. Darcy C.J., Davis J.S., Woodberry T., McNeil Y.R., Stephens D.P., Yeo T.W., Anstey N.M. An observational cohort study of the kynurenine to tryptophan ratio on sepsis association with impaired immune and microvascular function. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0021185.
15. Fallarino F., Grohmann U., Vacca C., Bianchi R., Orabona C., Spreca A., Orabona C., Spreca A., Fioretti M.C. and Puccetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death and Differentiation*, 2002, Vol. 9, no. 10, pp. 1069-1077.
16. Fallarino F., Grohmann U., Hwang K.W., Orabona C., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M.L., Fioretti M.C., Alegre M.-L. & Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nature Immunology*, 2003, Vol. 4, no. 12, pp. 1206-1212.
17. Fallarino F., Grohman U., You S., McGrath B.C., Cavener D.R., Vacca C., Orabona C., Bianchi R., Belladonna M.L., Volpi C., Santamaria P., Fioretti M.C., Puccetti P. The combined effect of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor ζ -chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 11, pp. 6752-6761.
18. Fallarino F., Grohman U., You S., McGrath B.C., Cavener D.R., Vacca C., Orabona C., Bianchi R., Belladonna M.L., Volpi C., Fioretti M.C., Puccetti P. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transplant Immunology*, 2006, Vol. 17, no. 1, pp. 58-60.
19. Fallarino F., Puccetti P. Toll-like receptor 9-mediated induction of the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism. *Eur. J. Immunol.*, 2006, Vol. 36, no. 1, pp. 8-11.
20. Fallarino F., Grohmann U., Puccetti P. Indoleamine 2,3-dioxygenase: From catalyst to signaling function. *Eur. J. Immunol.*, 2012, Vol. 42, no. 8, pp. 1932-1937.
21. Feunou P., Vanwetswinkel S., Gaudray F., Goldman M., Matthys P., Braun M.Y. Foxp3⁺CD25⁺ T regulatory cells stimulate IFN-gamma-independent CD152-mediated activation of tryptophan catabolism that provides dendritic cells with immune regulatory activity in mice unresponsive to staphylococcal enterotoxin B. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 2, pp. 910-917.
22. Furuzawa-Carballeda J., Lima G., Jakez-Ocampo J., Llorente L. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing peripheral cells in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus: a cross-selectional study. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2011, Vol. 41, no. 10, pp. 1037-1046.
23. Grohmann U., Fallarino F., Bianchi R., Belladonna M.L., Vacca C., Orabona C., Uyttenhove C., Fioretti M.C., Puccetti P. IL-6 inhibits the tolerogenic function of CD8 alpha⁺ dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, pp. 708-714.
24. Grohmann U., Fallarino F., Bianchi R., Orabona C., Vacca C., Fioretti M.C., Puccetti P. A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.*, 2003, Vol. 198, no. 1, pp. 153-160.
25. Higashitani K., Kanto T., Kuroda S., Yoshio S., Matsubara T., Kakia N., Oze T., Miyazaki M., Sakakibara M., Hiramatsu N., Mita E., Imai Y., Kasahara A., Okuno A., Takikawa O., Hayashi N., Takehara T. Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. *J. Gastroenterol.*, 2013, Vol. 48, pp. 660-670.
26. Holmgaard R.B., Zamarin D., Munn D.H., Wolchok J.D., Allison J.P. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a critical resistance mechanism in antitumor T cell immunotherapy targeting CTLA-4. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 7, pp. 1389-1402.
27. Holmgaard R.B., Zamarin D., Li Y., Gasmi B., Munn D.H., Allison J.P., Merghoub T., Wolchok J.D. Tumor-expressed IDO recruits and activates MDSC in a Treg-dependent manner. *Cell Reports*, 2015, Vol. 13, pp. 412-424.

28. Holmgaard R.B., Zamarin D., Lesokin A., Merghoub T., Wolchok J.D. Targeting myeloid-derived suppressor cells with colony stimulating factor-1 receptor blockade can reverse immune resistance tumors immunotherapy in indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing tumors. *EBioMedicine*, 2016, Vol. 6, pp. 50-58.
29. Hosseini-Tabatabael A., Baradar R., Li Y., Killani T., Rezakhanlou M.A., Ghahary A. Mechanism underlying interferon gamma-induced IDO expression in Non-obese diabetic mouse fibroblasts. *PLoS ONE*, 2012, Vol. 7, no. 5, pp. 1-11.
30. Hsu W.T., Lin C.-H., Chiang B.-L., Jui H.Y., Wu K. Kun-Yu, Lee C.-M. Prostaglandin E₂ potentiates Mesenchymal stem cell-induced IL-10⁺IFN- γ ⁺CD4⁺ regulatory T cells to control transplant arteriosclerosis. *J. Immunol.*, 2013, Vol. 190, pp. 2372-2380.
31. Inglis J.J., Criado G., Andrews M., Feldman M., Williams R.O., Selley M.L. The anti-allergic drug, N-(3,4'-dimethoxycinnamonyl) anthranilic acid, exhibit anti-inflammatory and analgesic properties in arthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 2007, Vol. 46, no. 9, pp. 1428-1432.
32. Jui H.Y., Lin C.H., Hsu W.T., Liu Y.R., Hsu R.B., Chiang B.L., Tseng W.Y., Wu K.K., Lee C.M. Autologous Mesenchymal stem cells prevent transplant arteriosclerosis by enhancing local expression of interleukin-10, interferon- γ , and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Cell Transplant.*, 2012, Vol. 21, no. 5, pp. 971-984.
33. Larrea E., Riezu-Boj J.I., Gil-Guerrero L., Casares N., Aldabe R., Sarobe P., Civeira M.P., Heeney J.L., Rollier C., Verstrepen B., Wakita T., Borrás-Cuesta F., Lasarte J.J., and Prieto J. Upregulation of indoleamine 2,3-dioxygenase in hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, 2007, Vol. 81, pp. 3662-3666.
34. Li Q., Harden J.L., Anderson C.D., Egilmez N.K. Tolerogenic phenotype of IFN- γ -induced IDO⁺ dendritic cells is maintained via an autocrine IDO-kynurenine/AhR-IDO loop. *J. Immunol.*, 2016, Vol. 197, no. 3, pp. 962-970.
35. Lim J.-Y., Im K.I., Lee E.S., Kim N., Nam Y.S., Jeon Y.W., Cho S.G. Enhanced immunoregulation of mesenchymal stem cells by IL-10-producing type 1 regulatory T cells in collagen-induced arthritis. *Scientific Reports*, 2016, Vol. 6. doi: 10.1038/srep26851.
36. Lood C., Tyden H., Gullstrana B., Klint C., Wenglen C., Nielsen C.T., Heegaard N.H.H., Jönsen A., Kahn R., Bengtsson A.A. Type I interferon-mediated skewing of the serotonin synthesis is associated with severe disease in systemic lupus erythematosus. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 4, e0125.
37. Manches O., Munn D., Fallahi A., Lifson J., Chaperot L., Plumas J., Bhardwaj N. HIV-activated human plasmacytoid DCs induce Tregs through an indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent mechanism. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 10, pp. 3431-3439.
38. Mancuso R., Hernis A., Agostini S., Rovaris M., Caputo D., Fichs D., Clerici M. Indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) expression and activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS ONE*, 2015, Vol. 10, no. 6. doi: 10.1371/journal.pone.0130715.
39. Mao R., Zhag J., Jiang D., Cai D., Levy J.M., Cuconati A., Block T.M., Guo J.-T., and Guo H. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates the antiviral effect gamma interferon against hepatitis B virus in human hepatocyte-derived cells. *J. Virol.*, 2011, Vol. 85, no. 2, pp. 1048-1057.
40. Mbongue J.C., Nicholas D.A., Torrez T.W., Kim N.S., Firek A.A., Langridge W.H.R. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in immune suppression and autoimmunity. *Vaccines*, 2015, Vol. 3, no. 3, pp. 703-729.
41. McIlroy D., Tanguy-Royer S., Le Meur N., Guisle I., Royer P.J., Leger J., Meflah K., Gregoire M. Profiling dendritic cell maturation with dedicated microarrays. *J. Leukocyte Biol.*, 2005, Vol. 78, no. 3, pp. 794-803.
42. Moon Y.W., Hajjar J., Hwu P., Naing A. Targeting the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in cancer. *J. Immunotherapy of Cancer*, 2015, Vol. 3, pp. 51-56.
43. Movahedi K., Guillemins M., Van den Bossche J., Van den Bergh R., Gysemans C., Beschin A., De Baetselier P and Van Ginderachter J.A. Identification of discrete tumor-induced myeloid-derived suppressor cell subpopulations with distinct T-cell-suppressive activity. *Blood*, 2008, Vol. 111, no. 8, pp. 4233-4244.
44. Munn D.H., Zhou M., Attwood J.T., Bondarev I., Conway S.J., Marshal B., Brown C., Mellor A.L. Prevention of allogenic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science*, 1998, Vol. 281, no. 5380, pp. 1191-1193.
45. Ogata M., Ito T., Shimamoto K., Nakanishi T., Satsutani N., Miyamoto R., Nomura S. Plasmacytoid dendritic cells have a cytokine-producing capacity to enhance ICOS ligand-mediated IL-10 production during T-cell priming. *International Immunology*, 2013, Vol. 25, no. 3, pp. 171-182.
46. Okamoto A., Nikaido T., Ochiai K., Takakura S., Saito M., Aoki Y., Ishii N., Yanaiharu N., Yamada K., Takikawa O., Kawaguchi R., Isonishi S., Tanaka T., Urashima M. Indoleamine 2,3-dioxygenase serves as a marker of poor prognosis in gene expression profiles of serious ovarian cancer cells. *Clin. Cancer Res.*, 2005, Vol. 11, no. 16, pp. 6030-6039.
47. Orabona C., Pallotta M.T., Volpi C., Fallarino F., Vacca C., Bianchi R., Belladonna M.L., Fioretti M.C., Grohmann U., Puccetti P. SOCS3 drives proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) and antagonizes IDO-dependent tolerogenesis. *PNAS*, 2008, Vol. 105, no. 52, pp. 20828-20833.
48. Orabona C., Pallotta M.T., Grohmann U. Different partness, opposite outcomes: a new perspective of the immunobiology of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Mol. Med.*, 2012, Vol. 18, pp. 834-842.
49. Palego L., Betti L., Rossi A., Giannaccini G. Tryptophan biochemistry: structural, nutritional, metabolic, and medical aspects in humans. *J. Amino Acids*, 2016, Vol. 2016, 13 p.
50. Pallotta M.T., Orabona C., Volpi C., Grohman U., Puccetti P., Fallarino F. Proteasomal degradation of indoleamine 2,3-dioxygenase in CD8⁺ dendritic cells is mediated by suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3). *International J. Tryptophan Res.*, 2010, Vol. 3, pp. 91-97.
51. Pallotta M.P., Orabona C., Volpi C., Vacca C., Belladonna M.L., Bianchi R., Servillo G., Brunacci C., Calvitti M., Bicciato S., Mazza E.M., Boon L., Grassi F., Fioretti M.C., Fallarino F., Puccetti P., Grohmann U.

Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nat. Immunol.*, 2011, Vol. 12, no. 9, pp. 870-878.

52. Pallotta M.T., Orabona C., Bianchi R., Vacca C., Francesca Fallarino F., Belladonna M.L., Volpi C., Mondanelli G., Gargaro M., Allegrucci M., Talesa V.N., Puccetti P., Grohmann U. Forced IDO1 expression in dendritic cells restores immunoregulatory signalling in autoimmune diabetes. *J. Cell. Mol. Med.*, 2014, Vol. 18, no. 10, pp. 2082-2091.

53. Pedersen E.R., Svingen G.F., Schartum-Hansen N., Ueland P.M., Ebbing M., Nordrehaug J.E., Iglund J., Seifert R., Nilsen R.M., Nygård O. Urinary excretion of kynurenine and tryptophan, cardiovascular events, and mortality after elective coronary angiography. *Eur. Heart J.*, 2013, Vol. 34, no. 34, pp. 2689-2726.

54. Pedersen E.R., Tuseth N., Eussen S.J., Ueland P.M., Strand E., Svingen G.F., Midttun O., Meyer K., Mellgren G., Ulvik A., Nordrehaug J.E., Nilsen D.W., Nygård O. Association of plasma kynurenine with risk of acute myocardial infarction in patients with stable angina pectoris. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2015, Vol. 35, no. 2, pp. 455-462.

55. Pfefferkorn E.R. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1984, Vol. 81, no. 3, pp. 908-912.

56. Platten M., Ho P.P., Youssef S., Fontoura P., Garren H., Hur E.M., Gupta R., Lee L.Y., Kidd B.A., Robinson W.H., Sobel R.A., Selley M.L., Steinman L. Treatment of autoimmune neuroinflammation with a synthetic tryptophan metabolite. *Science*, 2005, Vol. 310, no. 5749, pp. 850-855.

57. Popov A., Abdullah Z., Wickenhauser C., Saric T., Driesen J., Hanisch F.G., Domann E., Raven E.L., Dehus O., Hermann C., Eggle D., Debey S., Chakraborty T., Krönke M., Utermöhlen O., Schultze J.L. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 12, pp. 3160-3170.

58. Prendergast G.C., Metz R., Muller A.J., Merto L.M.F., Mandik-Nayak L. IDO2 in immunomodulation and autoimmune disease. *Frontiers in Immunology*, 2014, Vol. 5, pp. 1-6.

59. Puccetti P. On watching the watchers: IDO and type I/II IFN. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 4, pp. 876-879.

60. Radhakrishnan S., Cabrera R., Schenk E.L., Nava-Parada P., Bell M.P., Van Keulen V.P., Marler R.J., Felts S.J., Pease L.R. Reprogrammed FoxP3⁺ T regulatory cells become IL-17⁺ antigen-specific autoimmune effectors *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, no. 5, pp. 3137-3147.

61. Ravishankar B., Liu H., Shinde R., Chandler P., Baban B., Tanaka M., Munn D.H., Mellora A.L., Karlsson M.C.I., McGaha T.L. Tolerance to apoptotic cells is regulated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *PNAS*, 2012, Vol. 109, no. 10, pp. 3909-3914.

62. Robinson C.M., Hale P.T., Carlin J.M. The role of IFN- γ and TNF- α -responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J. Interferon Cytokine Res.*, 2005, Vol. 25, no. 1, pp. 20-30.

63. Rubin B.Y., Andersen D.L., Xing L., Powell R.J., Tate W.P. Interferon induces tryptophanyl-tRNA synthetase expression in human fibroblasts. *J. Biol. Chemistry*, 1991, Vol. 266, no. 36, pp. 24245-24248.

64. Samikkannu T., Rao K.V., Gandhi N., Saxena S.K., Nair M.P. Human immunodeficiency virus type 1 clade B and C Tat differentially induce indoleamine 2,3-dioxygenase and serotonin in immature dendritic cells implications for neuroAIDS. *J. Neuroviral.*, 2010, Vol. 16, no. 4, pp. 255-263.

65. Sarkhosh K., Tredget E.E., Karami A., Uludag H., Iwashina T., Kilani R.T., Ghahary A. Immune cell proliferation is suppressed by the interferon- γ -induced indoleamine 2,3-dioxygenase expression of fibroblasts populated in collagen gel (FPCG). *J. Cell Biochem.*, 2003, Vol. 90, no. 1, pp. 206-217.

66. Sasaki E., Ohta Y., Shinohara R., Ishiguro I. Contribution of serum albumin to the transport of orally administered L-tryptophan into liver of rats with L-tryptophan depletion. *Amino Acids*, 1999, Vol. 16, no. 1, pp. 29-39.

67. Schmidt S.V., Schultze J.L. New insight into IDO biology in bacterial and viral infections. *Frontiers in Immunology*, 2014, Vol. 5, pp. 1-12.

68. Schroecksadel K., Winkler B., Wirleitner B., Schennach H., Fuchs D. Aspirin down-regulates tryptophan degradation in stimulated human peripheral blood mononuclear cells *in vitro*. *Clinical and Experimental Immunology*, 2005, Vol. 140, no. 1, pp. 41-45.

69. Schroecksadel K., Winkler C., Duftner C., Wirleitner B., Schirmer M., Fuchs D. Tryptophan degradation increases with stage in patients with rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.*, 2006, Vol. 25, no. 3, pp. 334-337.

70. Sharma R., Di Dalmazi G., Caturegli P. Exacerbation of autoimmune thyroiditis by CTLA-4 blockade: a role for IFN- γ -induced indoleamine 2,3-dioxygenase. *Thyroid.*, 2016, Vol. 26, no. 8, pp. 1117-1124.

71. Strasser B., Becker K., Fuchs D., Gostner J.M. Kynurenine pathway metabolism and immune activation: peripheral measurement in psychiatric and co-morbid conditions. *Neuropharmacology*, 2016, pii: S0028-3908(16)30065-X.

72. Su J., Chen X., Huang Y., Li W., Cao K., Cao G., Zhang L., Li F., Roberts A.I., Kang H., Yu P., Ren G., Ji W., Wang Y., Shi Y. Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ.*, 2014, Vol. 21, no. 3, pp. 388-396.

73. Suarez-Fuentetaja N., Domenech-Garcia N., Paniagua-Martin M.J., Marzoa-Rivas R., Barge-Caballero E., Grille-Cancela Z., Pombo-Otero J., Muñiz-García J., Castro-Beirasa A., Crespo-Leiro M.G. Indoleamine 2-3 dioxygenase activity could be early marker of graft rejection in heart transplantation. *Transplantation Proc.*, 2012, Vol. 44, no. 9, pp. 2645-2648.

74. Suzuki Y., Suda T., Yokomura K., Suzuki M., Fujie M., Furuhashi K. Serum activity of indoleamine 2,3-dioxygenase predicts prognosis of community-acquired pneumonia. *J. Infect.*, 2011, Vol. 63, no. 3, pp. 215-222.

75. Tattevin P, Monnier D., Tribut O., Dulong J., Bescher N., Mourcin F. Enhanced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in patients with severe sepsis and septic shock. *J. Infect. Dis.*, 2010, Vol. 201, no. 6, pp. 956-966.
76. Taylor M.W., Feng G.S. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.*, 1991, Vol. 5, no. 16, pp. 2516-2522.
77. Theate I., van Baren N., Pilotte L., Moulin P., Larrieu P., Renaud J.C., Hervé C., Gutierrez-Roelens I., Marbaix E., Sempoux C., Van den Eynde B.J. Extensive profiling of the expression of the indoleamine 2,3-dioxygenase 1 protein in normal and tumoral human tissues. *Cancer Immunol. Res.*, 2015, Vol. 3, no. 2, pp. 161-172.
78. Thomas S.R., Mohr D., Stocker R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in interferon-gamma primed mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.*, 1994, Vol. 269, no. 20, pp. 14457-14464.
79. von Bubnoff D., Scheler M., Wilms H., von Bubnoff N., Häcker G., Schultze J., Popov A., Racz P., Bieber T., Wickenhauser C. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells and macrophages in infectious and noninfectious cutaneous granulomas. *J. Am. Acad. Dermatol.*, 2011, Vol. 65, no. 4, pp. 819-832.
80. von Bubnoff D., Wilms H., Scheler M., Brenk M., Koch S., Bieber T. Human myeloid dendritic cells are refractory to tryptophan metabolites. *Human Immunology*, 2011, Vol. 72, no. 10, pp. 791-797.
81. Wainwright D.A., Chang A.L., Dey M., Balyasnikova I.V., Kim C.K., Tobias A., Cheng Y., Kim J.W., Qiao J., Zhang L., Han Y., Lesniak M.S. Durable therapeutic efficacy utilizing combinatorial blockade against IDO, CTLA-4, and PD-L1 in mice with brain tumors. *Clin. Cancer Res.*, 2014, Vol. 20, no. 20, pp. 5290-5301.
82. Wan S., Xia C., Moral L. IL-6 produced by dendritic cells from lupus-prone mice inhibits CD4⁺CD25⁺ T cell regulatory functions. *J. Immunol.*, 2007, Vol. 178, no. 1, pp. 271-279.
83. Werner E.R., Bitterlich G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Szabo G., Dierich M.P., Wachter H. Human macrophages degrade tryptophan upon induction by interferon-gamma. *Life Sci.*, 1987, Vol. 41, no. 3, pp. 273-280.
84. Widner B., Laich A., Sperner-Unterwieser B., Ledochowski M., Fuchs D. Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression – What is the link? *Brain, Behavior, and Immunity*, 2002, Vol. 16, no. 5, pp. 590-595.
85. Williams RO. Exploitation of the IDO pathway in the therapy of rheumatoid arthritis. *International J. Tryptophan. Res.*, 2013, Vol. 6, no. 1, pp. 67-73.
86. Xu H., Zhang G.-X., Ciric B., Rostami A. IDO: a double-edged sword for T(H)1/T(H)2 regulation. *Immunol. Lett.*, 2008, Vol. 121, no. 1, pp. 1-6.
87. Xu S.Q., Wang C.Y., Zhu X.J., Dong X.Y., Shi Y., Peng J., Qin P., Sun J.-Z., Guo C., Ni H., Hou M. Decreased indoleamine 2,3-dioxygenase expression in dendritic cells and role of indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells in immune thrombocytopenia. *Annals of Hematology*, 2012, Vol. 91, no.10, pp. 1623-1631.
88. Xu J., Wei J., Zhu X., Zhang X., Guan J., Wang J., Yin J., Xiao Y., Zhang Y. Increased plasma indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interferon- γ levels correlate with the severity of acute graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Biol. Blood Marrow Transplant.*, 2013, Vol. 19, no. 2, pp. 196-201.
89. Xue Z.T., Sjogren H.O., Salford L.G., Widergren B. An epigenetic mechanism for high, synergistic expression of indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1) by combined treatment with zebularine and IFN-gamma potential therapeutic use in autoimmune diseases. *Mol. Immunol.*, 2012, Vol. 51, no. 2, pp. 101-111.
90. Yang X.O., Nurieva R., Martinez G.J., Kang H.S., Chung Y., Pappu B.P., Shah B., Chang S.H., Schluns K.S., Watowich S.S., Feng X.H., Jetten A.M., Dong C. Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs. *Immunity*, 2008, Vol. 29, no. 1, pp. 44-56.
91. Zhu L., Ji F., Wang Y., Zhang Y., Liu Q., Zhang J.Z., Matsushima K., Cao Q., Zhang Y. Synovial autoreactive T cells in rheumatoid arthritis resist IDO-mediated inhibition. *J. Immunol.*, 2015, Vol. 177, no. 11, pp. 8226-8233.
92. Zoso A., Mazza E.M.C., Biccato S., Mandruzzato S., Bronte V., Serafini P., Invernardi L. Human fibrocytic myeloid-derived suppressor cells express IDO and promote tolerance via Treg-cell expansion. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 11, pp. 3307-3319.

Авторы:

Козлов В.А. — д.м.н., профессор, академик РАН, научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Демина Д.В. — к.м.н., заведующая отделением аллергологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

Kozlov V.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Director for Research, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Demina D.V., PhD (Medicine), Head, Department of Allergology, The Immunopathology Clinics, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 08.12.2016
Принята к печати 26.12.2016

Received 08.12.2016
Accepted 26.12.2016

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ФАКТОРЫ (ГЕНЫ РЕЦЕПТОРОВ ВРОЖДЕННОГО ИММУНИТЕТА – TLRs) В ПАТОГЕНЕЗЕ АТЕРОСКЛЕРОЗА И ЕГО ОСЛОЖНЕНИЙ

Жидкова И.И.¹, Понасенко А.В.¹, Хуторная М.В.¹, Кутихин А.Г.¹,
Барбараш О.Л.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»,
г. Кемерово, Россия

² ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Кемерово, Россия

Резюме. Имеется генетически обусловленная предрасположенность к развитию атеросклероза и его осложнений (развитие инфаркта миокарда [ИМ], прогрессирующая стенокардия, острое нарушение мозгового кровообращения [ОНМК] по ишемическому типу), в которой одно из приоритетных мест отводится генам рецепторов врожденного иммунитета – TLRs (Toll-like рецепторы). Определение аллельных вариантов генов рецепторов врожденного иммунитета (TLRs) является одним из перспективных направлений в изучении генетических факторов риска развития воспаления в сосудистой стенке, а также формирования и стабильности атеросклеротической бляшки (АСБ). В патогенез атеросклероза вовлечено огромное количество клеток иммунной системы, биологически активных веществ, оказывающих различные влияния на сосудистую стенку и участвующих в реализации универсальной реакции воспаления. Развитие локальной воспалительной реакции, лежащее в основе дестабилизации бляшек и дисфункции эндотелия, связано с активацией TLRs и индукцией синтеза провоспалительных цитокинов. В обзоре проведен анализ данных литературы, раскрывающих роль вариативности аллельных вариантов генов (TLRs) в развитии и прогрессировании атеросклероза и его осложнений. Поиск генетических маркеров риска развития атеросклероза является эффективным методом персонализированной медицины, способствующей составлению прогноза течения заболевания и разработки профилактических мероприятий с целью предупреждения прогрессирования данной патологии.

Ключевые слова: атеросклероз, полиморфизм генов, TLRs, аллельные варианты, рецепторы врожденного иммунитета, воспаление, иммунный ответ

GENOMIC FACTORS (TOLL-LIKE RECEPTORS GENES) IN DEVELOPMENT OF ATHEROSCLEROSIS AND ITS CLINICAL MANIFESTATIONS

Zhidkova I.I.^a, Ponasenko A.V.^a, Khutornaya M.V.^a, Kutikhin A.G.^a,
Barbarash O.L.^{a, b}

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

^b Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Abstract. Development of atherosclerosis and its clinical manifestations, i.e. unstable angina, myocardial infarction, and ischemic stroke, is largely determined by a genetic inheritance, particularly inherited variation

Адрес для переписки:

Жидкова Ирина Игоревна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний»
650002, Россия, г. Кемерово, Сосновый бульвар, 6.
Тел.: 8 (384) 264-45-71.
E-mail: Irina04046@yandex.ru

Address for correspondence:

Zhidkova Irina I.
Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular
Diseases.
650002, Russian Federation, Kemerovo, Sosnovy blvd, 6.
Phone: 7 (384) 264-45-71.
E-mail: Irina04046@yandex.ru

Образец цитирования:

И.И. Жидкова, А.В. Понасенко, М.В. Хуторная,
А.Г. Кутихин, О.Л. Барбараш «Генетические факторы
(гены рецепторов врожденного иммунитета – TLRs)
в патогенезе атеросклероза и его осложнений»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 241-254.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-241-254

© Жидкова И.И. и соавт., 2017

For citation:

I.I. Zhidkova, A.V. Ponasenko, M.V. Khutornaya,
A.G. Kutikhin, O.L. Barbarash "Genomic factors (Toll-like
receptors genes) in development of atherosclerosis and its clinical
manifestations", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya
Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 241-254.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-241-254

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-241-254

of the genes encoding Toll-like receptors (TLRs), a major effector of innate immune system. Polymorphisms of the *TLR* genes may affect vascular inflammation, as well as plaque formation and its stability.

Mirades of immune cells and bioactive substances are involved into pathogenesis of atherosclerosis. They exert different effects upon vascular wall and participate in development of universal inflammatory response. Local inflammatory reaction underlies atherosclerotic plaque destabilization and endothelial dysfunction. This response is associated with TLR activation and induced synthesis of proinflammatory cytokines. Here we review the literature on the role of inherited variations within the *TLR* genes in the development and progression of atherosclerosis and its complications. Moreover, we conclude that a search for genomic markers of atherosclerosis, e.g., TLR gene polymorphisms, may be applied in personalized cardiovascular medicine, in order to predict clinical course and evolution of the disorder, like as to perform prophylactic measures aimed for prevention of the disease progression.

Keywords: atherosclerosis, gene polymorphisms, Toll-like receptors, allelic variants, innate immune receptors, inflammation, immune response

Список сокращений

АГ – артериальная гипертензия, АСБ – атеросклеротическая бляшка, ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота, ИБС – ишемическая болезнь сердца, ИИ – ишемический инсульт, ИМ – инфаркт миокарда, КА – коронарная артерия, ЛПС – липополисахарид, ОНМК – острое нарушение мозгового кровообращения, РНК – рибонуклеиновая кислота, СЖК – свободные (насыщенные) жирные кислоты, ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания, ССО – сердечно-сосудистые осложнения, ХС ЛПВП – холестерин липопротеинов высокой плотности, ХС ЛПНП – холестерин липопротеинов низкой плотности, DAMPs – damage associated molecular patterns (молекулярные паттерны, связанные с повреждением), СД – сахарный диабет 2-го типа, СРР – С – реактивный белок, IFN – интерферон, IL – интерлейкин, LRR домен – leucine-rich repeat domain, NF-κB – транскрипционный ядерный фактор, PAMPs – патоген-ассоциированные молекулярные «образы» (pathogen-associated molecular patterns), SNP – single nucleotide polymorphisms (однонуклеотидные полиморфизмы), TIR домен – Toll interleukin-1 receptor domain, TLRs – Toll-подобные рецепторы (Toll-like receptors), TNFα – фактор некроза опухоли-α, PRRs – рецепторы, воспринимающие «образы» патогенов (pattern recognition receptors).

Введение

Атеросклероз является мультифакториальным (МФЗ) заболеванием, обусловленным сложным комплексным взаимодействием генетических и средовых факторов. Воспаление – основа универсальной защитной реакции, направленная на освобождение организма от патогенов (бактерий, вирусов) и от последствий повреждения (некроза клеток и тканей), лежащая в основе многих заболеваний, в том числе атеросклероза [52]. Поэтому актуальным является поиск пускового фактора, осуществляющего инициацию провоспалительных реакций в артериальной стенке, а также триггерных механизмов, способных оказывать влияние на степень выраженности воспалительной реакции. Понимание генетической составляющей в этиологии и патогенезе МФЗ помо-

жет в разработке новых стратегий диагностики, первичной, вторичной профилактики и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Наиболее перспективными для изучения, по данным различных авторов, являются рецепторы врожденного иммунитета – Toll-like рецепторы, демонстрирующие участие в атерогенезе.

Врожденный иммунитет обеспечивает специфическое распознавание патогенов с помощью ограниченного числа генетически запрограммированных паттернраспознающих рецепторов (PRRs – pattern recognition receptors), эволюционно отобранных, взаимодействующих с PAMPs патоген-ассоциированные молекулярные «образы» (pathogen – associated molecular patterns) (PAMPs рибонуклеиновой кислоты [РНК] и дезоксирибонуклеиновой кислоты [ДНК] вирусов и бактерий, липополисахаридом [ЛПС] бактериальной стенки грамотрицательных бактерий). Одними из главных рецепторов врожденного иммунитета являются сигнальные PRRs, которые иницируют пути передачи сигнала в ядро клетки для активации генов адаптивного ответа. Наиболее изученные и важные из сигнальных PRRs – это Toll-like рецепторы. До настоящего времени идентифицировано 10 рецепторов TLRs человека [8, 40].

Строение, классификация, локализация и функции TLRs

В зависимости от локализации TLRs условно разделены на две подгруппы: TLRs, которые экспрессируются на цитоплазматической мембране клетки (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR10), и TLRs, которые локализуются и проявляют свою активность на мембранах внутриклеточных везикул, таких как лизосомы, эндосомы, эндоплазматический ретикулум (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) [20, 64]. Некоторые TLRs могут присутствовать на различных мембранных структурах клетки. Например, TLR4 локализуется на цитоплазматической мембране и на мембране аппарата Гольджи. Он связывает эндотоксин ЛПС из грамотрицательных бактерий и является главным рецептором врожденного иммунитета, активация которого сопровождается экспрессией генов цитокинов и других сигнальных пептидов. TLRs активируются как экзогенными лигандами (патогенами вирусов, бактерий, грибов), так и

эндогенными (свободными жирными кислотами [СЖК], модифицированными ХС ЛПНП, фибриногеном) [24, 40].

TLR2, TLR4 и TLR6 функционируют в качестве основных врожденных датчиков у млекопитающих для распознавания клеточной стенки компонентов грамотрицательных бактерий, а субсемейство TLR2 (TLR1, TLR2, TLR6 и TLR10) участвует в распознавании липопептидов. Внутриклеточные TLR3 распознают вирусную двухцепочечную РНК, а TLR7, TLR8, TLR9 – нуклеиновые кислоты. Рецепторы клеточной мембраны, такие как TLR4, связывают эндотоксин ЛПС грамотрицательных бактерий, активация которого сопровождается экспрессией генов цитокинов и других сигнальных пептидов, что позволяет выделить его ключевую роль в реализации реакций врожденного иммунитета; TLR5 распознает бактериальные белки жгутиков; рецептор TLR2 уникален своей способностью образовывать гетеродимеры с TLR1, TLR6 на поверхности цитоплазматической мембраны. Гетеродимер TLR2-TLR6 распознает диацелированные липопептиды грамположительных бактерий и микоплазм, а комплекс TLR2-TLR1 – триацелированные липопептиды грамотрицательных бактерий и микоплазм. Гомодимеры TLR1, TLR2 и TLR6 сами функционально неактивны. Такая особенность рецептора TLR2 обеспечивает широкий диапазон распознавания патоген-ассоциированных молекулярных паттернов. Так, TLR10 может образовывать гетеродимеры с TLR1 или TLR2, но его лиганд в настоящее время неизвестен; комплекс TLR11-TLR1/TLR2 распознает молекулы уропатогенных бактерий [1, 48, 55].

Большинство TLRs экспрессируются иммунными клетками – макрофагами, моноцитами, нейтрофилами, лейкоцитами, тучными и дендритными клетками. Также имеются данные об экспрессии TLRs на поверхности тканей: эпителиальных клетках кишечника, респираторного и урогенитального трактов, эндотелии сосудов, кардиомиоцитах, гепатоцитах, клетках кожи и почечного эпителия, адипоцитах, инсулинчувствительных тканях [47].

TLRs представляют собой трансмембранные одноцепочечные сигнальные рецепторные белки. Функция TLRs обеспечивается особенностями их строения: они имеют внеклеточную и внутриклеточную части. Внеклеточная часть TLRs, богатая лейцином (LRR домен – leucine-rich repeat domain), связывается с лигандами (компонентами клетки) микроорганизмов. Варибельность в генах, кодирующих LRR домены TLRs, приводит к изменению строения (конфигурации) внеклеточных доменов, что способствует нарушению проведения сигнала от активированного рецептора внутрь клетки (снижению распознавания лигандов данных рецепторов) с последующим изменением воспалительного ответа. В неактивном состоянии TLRs находятся в мембране в мономерном состоянии. При активации они

димеризуются, что приводит к последующей передаче сигнала внутрь клетки. Олигомерный рецептор способен связывать несколько внутриклеточных адаптерных белков, которые обеспечивают последующую передачу сигнала [7].

Внутриклеточная часть TLRs (TIR домен – Toll interleukin-1 receptor domain), гомологичная внутриклеточному домену интерлейкина 1 (IL-1) структура, ответственная за взаимодействие с адаптерными молекулами внутриклеточных сигнальных путей, что приводит к индукции синтеза провоспалительных генов и экспрессии интерферонов 1 типа, а также апоптоза. Выделяют два пути активации через адаптерные молекулы: MyD88-зависимый и TRIF-зависимый.

Сигнальный MyD88-зависимый путь является универсальным для большинства TLR (исключение TLR3 и TLR4). Активированный TLRs посредством TIR-домена связывается с адаптерным белком MyD88 (белок-88 миелоидной дифференцировки первичного генного ответа), который является связующим звеном между TLR и первой сигнальной киназой IRAK-4 (IL-1 рецептор-ассоциированная киназа-4). В результате осуществляется активация белков IRAKs, что через каскад событий приводит к активации транскрипционных факторов (NF-κB [ядерный фактор транскрипции], AP-1 [активирующий белок-1]).

Установлено, что TLR3 и TLR4 рецепторы используют только TRIF-зависимый путь. Стимулированные TLRs связываются и активируют TRIF (TIR-доменсодержащий адаптер, индуцирующий IFN γ [интерферон- γ]). Взаимодействие TRIF с TRAF активирует транскрипционный фактор IRF3 (интерферон регулирующий фактор-3), который преимущественно индуцирует экспрессию IFN β (интерферон β). Стимуляция белка RIP1 (взаимодействующий с рецептором белок 1) приводит к активации NF-κB. Третий сигнальный путь индуцирует апоптоз [3, 7].

Фактор NF-κB обладает свойством образовывать связи с промоторными участками ряда генов, что обеспечивает их экспрессию, синтез гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, провоспалительных и противовоспалительных цитокинов (IL-1, интерлейкин 6 [IL-6]), фактор некроза опухоли α (TNF α), адгезивных молекул межклеточного взаимодействия, острофазных белков (амилоидного белка, белков теплового шока, CRP [С-реактивный белок]), хемокинов [4, 63]. Кроме того, TLRs также играют ключевую роль в патогенезе асептического воспаления, посредством активации через эндогенные лиганды, высвобождающиеся при повреждении клеток (так называемых молекулярных паттернов, связанных с повреждением, – damage associated molecular patterns, DAMPs). Аналогично PAMPs, DAMPs активируют внутриклеточный путь сигнализации с последующим синтезом провоспалительных цитокинов и формированием типичной тканевой воспалительной реакции [33, 46].

Участие TLRs в патогенезе атеросклероза

Развитие воспаления, лежащее в основе дестабилизации бляшек и дисфункции эндотелия, связано с активацией TLRs и индукцией синтеза провоспалительных цитокинов. TLRs являются ключевыми активаторами моноцитов и макрофагов. Накапливающиеся в области АСБ модифицированные ХС ЛПНП могут служить эндогенными лигандами для TLR4. Лигандами TLRs в зоне бляшки также служат белки теплового шока и компоненты микроорганизмов, проникающих под фиброзную покрывку. Механизмы повреждения после активации TLRs рецепторов заключаются в развитии асептического воспаления без участия патогенов и сводятся к активной продукции метаболитов арахидоновой кислоты, к выбросу кислородных радикалов, дегрануляции лейкоцитов с выходом в ткани эластазы и протеолитических ферментов, простагландинов и фактора, активирующего тромбоциты [33, 46, 58, 66].

Наличие персистирующей инфекции (граммотрицательные бактерии *C. Pneumoniae*, вирусы [Cytomegalovirus, Human herpesvirus 4]) в артериальной стенке также способно запустить внутрисосудистый воспалительный процесс посредством TLRs [41].

Активация данных рецепторов запускает каскад основных проатерогенных цитокинов (IL-12, IL-18, TNF α). Дальнейшее развитие реакции воспаления приводит к активации процесса формирования АСБ, привлечению новых клеток, полному закрытию просвета сосуда или переходу бляшки в стадию распада (дестабилизации АСБ) с образованием тромбов, также способных закрыть просвет сосуда и вызвать серьезные осложнения (прогрессирующую стенокардию, ИМ, ОНМК) [1].

Эпидемиологические и клинические данные показывают, что хроническое воспаление и инфекция увеличивают риск ишемической болезни сердца (ИБС) и атеросклероза, а также связанных с ними сердечно-сосудистых осложнений (ССО), таких как инсульт и ИМ [1, 10]. Например, в исследовании Вгеа D. с соавторами [19] показано, что повышенный уровень экспрессии TLR2 и TLR4 ассоциируется с плохим прогнозом ОНМК и коррелирует с более высоким уровнем в сыворотке крови интерлейкинов IL-6 и TNF α . На моноцитах периферической крови пациентов с нестабильной стенокардией, ИМ и хронической сердечной недостаточностью выше уровни экспрессии TLR2, TLR4, чем у пациентов со стабильной стенокардией или здоровых людей [5, 38]. У больных с ИМ с подъемом сегмента ST повышенная экспрессия на моноцитах TLR4 является независимым предиктором 30-дневных основных неблагоприятных клинических исходов [59].

На основании данных литературы можно представить следующую принципиальную схему участия TLRs в патогенезе атеросклероза (рис. 1).

Таким образом, пусковым звеном патогенеза атеросклероза могут быть воспалительные ре-

акции, запускаемые вследствие взаимодействия TLRs с экзогенными лигандами персистирующих микроорганизмов и/или эндогенными лигандами самого организма, а также полиморфизм генов данных рецепторов [75].

Изменение в структуре TLRs в результате однонуклеотидных полиморфизмов часто ассоциируется с различными инфекционными заболеваниями (сепсисом, туберкулезом), развитием и прогрессированием таких воспалительных заболеваний, как атеросклероз, ИМ, артериальная гипертензия (АГ), ОНМК, сахарный диабет 2-го типа (CD) [24, 44, 60, 62].

Строение, локализация генов системы TLRs и ассоциации генов рецепторов врожденного иммунитета с атеросклерозом и его осложнениями

У человека 10 генов, кодирующих TLRs, расположены на хромосомах 4, 9, 1, X и 3. На хромосоме 4 расположены гены *TLR1*, *TLR2*, *TLR3*, *TLR6* и *TLR10*. На хромосоме 9 расположен ген *TLR4*, на хромосоме 1 – ген *TLR5*. Гены *TLR7* и *TLR8* расположены на X хромосоме (Xp22.3), а ген *TLR9* – на хромосоме 3 (3p21.3) [21, 26].

Ген *TLR1* локализован на 4-й хромосоме. Установлено, что G аллель rs5743551 данного гена ассоциирован с повышенной TLR1-опосредованной продукцией цитокинов [27]. Интересна замена 1805 T>G в кодирующей области гена *TLR1*. Данный вариативный сайт с высокой частотой встречается у европеоидов (75%) и приводит к замене изолейцина на серин в положении 602 TLR1. Аминокислотная замена сопровождается нарушением доставки вновь синтезированной молекулы рецептора к цитоплазматической мембране. В результате снижается на 60% активация фактора транскрипции NF- κ B [2].

Ген *TLR4* локализован на коротком плече 9-й хромосомы (9q33.1). Для гена *TLR4* описаны 7 синонимичных SNP (SNP – single nucleotide polymorphisms [однонуклеотидные полиморфизмы]) (однонуклеотидные замены, найденные в экзонных областях генома и не приводящие к аминокислотным заменам в кодируемых белках) и 28 несинонимичных SNP. Наиболее изучены из них два несинонимичных аллельных варианта гена *TLR4*: rs4986790 (Asp299Gly), который вызывает замену аспарагиновой кислоты на глицин в экзоне 3 в положении 299 полипептидной цепи во внеклеточном домене рецептора; rs4986791 (Thr399Ile), замену тирозина на изолейцин в точке 399 белка. Эти аллельные варианты гена *TLR4* приводят к изменению во внеклеточном домене (осуществляющий взаимодействие TLR4 с лигандами), что нарушает передачу сигнала при контакте с ЛПС и приводит к снижению иммунного ответа. Самая высокая частота встречаемости мутантного аллеля G гена *TLR4* выявлена в африканских популяциях и составляет от 10 до 18%. Носители редкого мутантного G аллеля гена *TLR4* не превышают 7% населения мира, а в азиатских популяциях этот полиморфизм практически не выявлен. По результатам

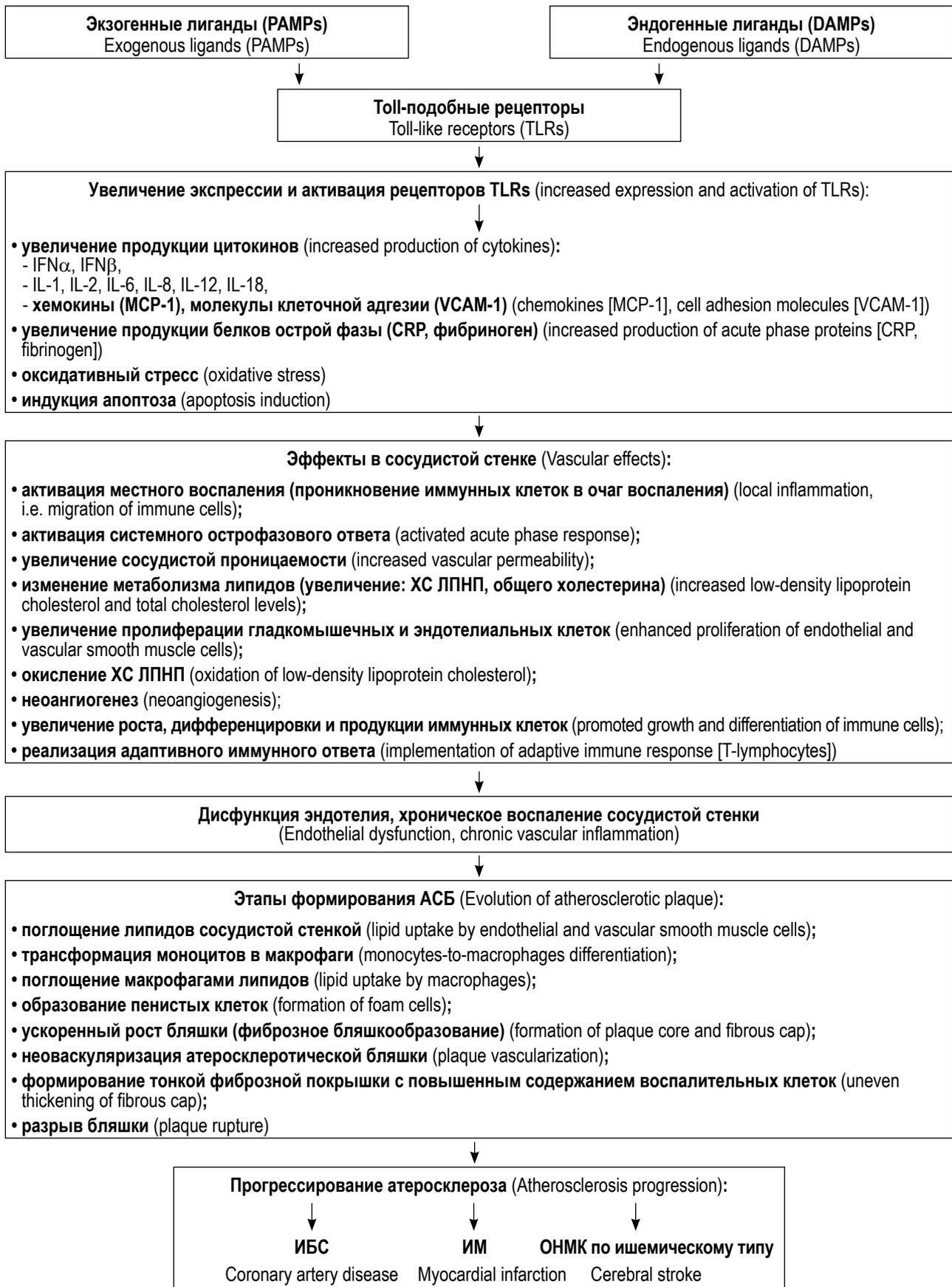


Рисунок 1. Участие TLRs в патогенезе атеросклероза
Figure 1. TLRs in atherosclerosis

проводимых исследований мутантный аллель rs4986791 (Thr399Ile) встречается у 3-6% населения Европы и Америки, не выявлен в Азии, регистрируется у 2% жителей Африки. Наличие аллеля G rs4986790 гена *TLR4* сопровождается провоспалительным фенотипом, тогда как *TLR4* (Asp299Gly) и (Thr399Ile) *TLR4* гаплотип не имеет функциональных отличий от дикого типа *TLR4*. Функционально незначимый гаплотип *TLR4* Asp299Gly / *TLR4* Thr399Ile отсутствует в азиатских популяциях, присутствует в 1-2% случаев в африканских популяциях [15].

Ген *TLR2* локализован на длинном плече 4-й хромосомы (4q32). Известно около 89 SNPs, 29 из них локализовано в интронной части гена и 17 – на третьем экзоне *TLR2* [21]. Из них шесть смысловых SNPs гена *TLR2* связаны с заменой аминокислоты в цитозольной части рецептора, включая 5 SNPs в пределах TIR-домена (аминокислоты 643-784). Эти полиморфные варианты *TLR2* приводят к снижению сигнальной функции рецептора, что сопровождается снижением активности NF-κB, и, как следствие, повышают восприимчивость к инфекции [73]. При аллельном варианте rs5743708 гена *TLR2* происходит замена аргинина (Arg) глутамином (Gln) в позиции 753. Этот аллельный вариант гена *TLR2* был выявлен у 3% здоровых европеоидов [21]. Наиболее высокая частота встречаемости его характерна для немцев (9,4%) [32, 74]. Замена аминокислоты на глутамин (rs5743708) в гене *TLR2* приводит к конформационным изменениям в TIR-доме (внутриклеточной части молекулы) и нарушению передачи сигнала с рецептора *TLR2*, в результате чего происходят снижение выработки провоспалительных цитокинов и активное распространение инфекции среди носителей минорного аллеля по сравнению с носителями основного аллеля. Причем нарушение функции рецептора *TLR2* при данном аллельном варианте наблюдается при гомозиготном варианте носительства (G/G), а при гетерозиготном варианте наблюдается такой же уровень синтеза цитокинов, как и у носителей неизмененного генотипа (A/A) [32, 74].

Аллельный вариант гена *TLR2* 753Gln также нарушает работу *TLR2* – сигнального пути и димеризацию с *TLR6*, что сопровождается снижением иммунного ответа [32].

На четвертой хромосоме локализован комплекс родственных генов, обуславливающих иммунный ответ: *TLR10* / *TLR1* / *TLR6*. Такое хромосомное размещение предполагает близкую генетическую связь *TLR6* с генами *TLR1*, *TLR10*, что, в свою очередь, может оказать влияние на качественные и количественные характеристики сигналинга от множественных гетеродимерных комплексов TLRs [48]. Сам ген *TLR6* локализован на коротком плече четвертой хромосомы (4p13). При наличии вариантного аллеля по rs5743810 гена *TLR6* (замена серина [Ser] пролином [Pro] в позиции 249), что приводит к снижению воспалительного ответа [25, 57].

Все вышеизложенное свидетельствует в пользу наличия зависимости механизмов атерогенеза от вариантного состояния генов, кодирующих ключевые рецепторы врожденного иммунного ответа – TLRs, и к настоящему времени уже имеется ряд данных, подтверждающих данное положение. В таблице 1 приведены результаты исследований по изучению ассоциаций мутантных аллелей генов *TLRs* с атеросклерозом и его осложнениями. Анализируя опубликованные данные, следует отметить, что накопленные знания имеют противоречивый характер. Так, из тридцати двух эпидемиологических исследований восемь констатируют защитный эффект G аллеля rs4986790 (Asp299Gly) *TLR4*, в пяти установлено, что он является аллелем риска, а в девятнадцати никакой корреляции между данным аллелем и риском атеросклероза и его осложнений (ИМ, ОНМК), поражением коронарных артерий (КА), развитием ИБС не обнаружено (табл. 1).

Однако, ни в одном из шести проведенных исследований не было выявлено ассоциаций минорного аллеля (Asp299Gly) гена *TLR4* с развитием инсульта, в одном исследовании был показан протективный эффект минорного аллеля данного варибельного сайта гена *TLR4* в отношении развития ОНМК. Однако, в исследовании Weinstein J.R. с соавторами показано, что минорные аллели Asp299Gly и Thr399Ile гена *TLR4* связаны с риском неблагоприятного прогноза после перенесенного ОНМК в течение 3-х месяцев (табл. 1).

Проведено двенадцать исследований по ассоциации аллеля T Thr399Ile гена *TLR4* с риском атеросклероза и его осложнений, только в одном исследовании установлено, что он является аллелем риска развития ИМ, и в одном исследовании выявлена ассоциация данного аллеля с неблагоприятным исходом перенесенного ОНМК, в десяти никакой корреляции не обнаружено. Ни в одном из четырех проведенных исследований не было выявлено ассоциаций минорного аллеля данного варибельного сайта *TLR4* с развитием инсульта (табл. 1).

Количество исследований в отношении других варибельных сайтов (rs5743708 [Arg753Gln], rs3804099 [Asn199Asn] гена *TLR2*; rs5743551 гена *TLR1* и rs5743810 [Ser249Pro] гена *TLR6*) весьма ограничено.

В одном исследовании выявлена протективная роль мутантного аллеля rs5743708 (Arg753Gln) *TLR2*: в отношении риска развития ОНМК. В одном исследовании ассоциаций минорного аллеля данного варибельного сайта *TLR2* с ИМ не выявлено, то же было в одном исследовании с риском развития ОНМК. Проведено 2 исследования, в которых не выявлено ассоциаций мутантного аллеля rs3804099 (Asn199Asn) *TLR2* с риском развития ИМ и ОНМК, однако авторы предположили их влияние на тяжесть инсульта (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. АССОЦИИИ МУТАНТНЫХ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ TLRs С АТЕРОСКЛЕРОЗОМ И ЕГО ОСЛОЖНЕНИЯМИ

TABLE 1. ASSOCIATION OF THE TLR GENE POLYMORPHISMS WITH ATHEROSCLEROSIS AND ITS COMPLICATIONS

Аллель Allele	Обнаруженная ассоциация Association	Популяция, объем выборки Population and sample size
rs4986790 (Asp299Gly) of the TLR4 gene		
G	↓ риск атеросклероза брахио-цефальных артерий; ↓ концентрации провоспалительных цитокинов и остро-фазовых показателей ↓ risk of brachiocephalic atherosclerosis; ↓ levels of pro-inflammatory cytokines and acute phase proteins	Итальянцы, 4 группы: по 125 женщин и мужчин от 40 до 49 лет, от 50 до 59 лет, от 60 до 69 лет, от 70 до 79 лет [35] Italian, 4 groups: 125 males and females 40-49, 50-59, 60-69, and 70-79 years [35]
	↓ риск развития ИМ (3 исследования) ↓ risk of MI* (3 studies)	Белые европейцы, 183 человека с острым коронарным синдромом и 216 человек (контрольная группа) [12] Caucasian, 183 patients with acute coronary syndrome and 216 healthy controls [12]
		Немцы, 105 мужчин с ИМ средний возраст 41 год. Группа контроля 127 мужчин средний возраст 38 лет [13] German, 105 males with MI and 127 healthy controls [13]
		Итальянцы с развитием ИМ в молодом возрасте [31] Italian, young patients with MI [31]
	↓ риск атеросклеротического поражения КА, ↓ уровня CRP ↓ risk of coronary atherosclerosis, ↓ CRP level	Американцы (белые), 1894 пациентов без ИМ и проведенной КАГ [37] Caucasian, 1894 patients without MI after coronary angiography [37]
	↓ риск развития ИИ ↓ risk of IS	Россия (Забайкальский край без определения национальной принадлежности), 128 пациентов с ИИ и 113 человек группа контроля [6] Russian, 128 patients with IS and 113 healthy controls [6]
	↓ риск развития ССО у пациен-тов, принимающих статины ↓ risk of CVE in patients who received statins	655 мужчин с ангиографически подтвержденным атеросклерозом КА [18] 655 males with CA [18]
	↓ риск развития ИМ у пациен-тов, принимающих статины ↓ risk of MI in patients who received statins	Метаанализ трех независимых исследований в Англии [29] Meta-analysis of three separate English studies [29]
	↑ риск выраженного атеро-склероза КА ↑ risk of severe CA	Норвежцы, 230 пациентов с проведением коронарографии. 130 пациентов имели стеноз более > 50% как минимум в од-ной КА. У 100 пациентов стенозов КА не выявлено (контроль-ная группа) [17] Norwegian, 230 patients after coronary angiography: 130 patients with > 50% coronary stenosis and 100 healthy controls [17]
	↑ риск неблагоприятного про-гноза после перенесенного ИИ ↑ risk of CVE after IS	113 пациентов с ИИ [67] 113 patients with IS [67]
↑ повышает риск развития ИМ (3 исследования) ↑ risk of MI* (3 studies)	Французы, британцы, 9758 здоровые мужчины в возрасте 50-59 лет [49] French and British, 9758 healthy males [49]	
	Шведы, 1213 пациентов, перенесших первый ИМ и 1561 (кон-трольная группа) [23] Swedish, 1213 patients with MI and 1561 healthy controls [23]	
	Украинцы, 31 образец аутопсии от пациентов с установлен-ным диагнозом ИБС и 5 аутопсий у пациентов без ИБС [11] Ukrainian, 31 patients with CAD and 5 healthy controls [11]	

Таблица 1 (продолжение)

Аллель Allele	Обнаруженная ассоциация Association	Популяция, объем выборки Population and sample size
G	Не выявлено ассоциаций с возрастанием риска развития ИМ (7 исследований) No association with MI (7 studies)	Американцы разной этнической принадлежности: 695 лиц с ИМ или ИИ, и 695 группа контроля [71] American, 695 MI or IS patients, and 695 healthy controls [71]
		Финны, 657 мужчин, средний возраст 53 года [28] Finnish, 657 males [28]
		Немцы, 3657 пациентов с ИМ и 1211 здоровых людей (с ангиографически нормальными КА) [36] German, 3657 patients with MI and 1211 healthy controls [36]
		Немцы, 273 долгожителя мужчины в возрасте 95-107 лет, 606 мужчин с перенесенным ИМ в молодом возрасте и 594 человека (контрольная группа) [50] German, 273 male centenarians, 606 young males with MI, and 594 healthy controls [50]
		Хорваты, 240 человек (120 с острым ИМ и 120 контрольная группа) [22] Croatian, 240 patients: 120 with MI and 120 healthy controls [22]
		Мексиканцы, 457 с ИМ и 283 лиц без ИМ [45] Mexican, 457 patients with MI and 283 healthy controls [45]
		Метаанализ, 15148 случаев (8299 пациентов с ИМ и 6848 здоровых пациентов) [69] Meta-analysis, 15148 patients: 8299 with MI and 6848 healthy controls [69]
	Не выявлено ассоциаций с атеросклерозом аорты No association with aortic atherosclerosis	140 пациентов с проведенной ангиографией (атеросклероз аорты и почечных артерий) [30] 140 patients with aortic atherosclerosis [30]
	Не выявлено ассоциаций с развитием рестеноза стентов No association with in-stent restenosis	Голландцы, 2682 пациентов с успешным чрескожным вмешательством [16] 2682 patients with percutaneous coronary intervention [16]
	Не выявлено ассоциаций с развитием ИБС No association with CAD	286 больных с CD и 413 лиц без CD и ИБС [44] 286 patients with CAD and 413 healthy controls [44]
Не выявлено ассоциаций с ↑риска развития атеросклероза No association with atherosclerosis	Метаанализ 15 исследований (9989 с атеросклерозом и 6746 контрольная группа) [72] Meta-analysis of 15 studies (9989 with atherosclerosis and 6746 healthy controls) [72]	
Не ассоциирован с прогрессированием атеросклероза у пациентов с семейной гиперхолестеринемией No association with atherosclerosis progression in patients with familial hypercholesterolemia	293 пациента с семейной гиперхолестеринемией и 200 здоровых лиц [51] 293 patients with familial hypercholesterolemia and 200 healthy controls [51]	
Не выявлено ассоциаций с развитием ИИ (6 исследований) No association with IS (6 studies)	Немцы, с CD, с ишемией головного мозга и 139 здоровых лиц [56] German, patients with IS and 139 healthy controls [56]	
	Американцы разной этнической принадлежности, 695 лиц с ИМ или инсультом и 695 группа контроля [71] American, 695 patients with MI or IS and 695 healthy controls [71]	
	Итальянцы, 1256 пациентов [53] Italian, 1256 patients [53]	

Таблица 1 (продолжение)

Аллель Allele	Обнаруженная ассоциация Association	Популяция, объем выборки Population and sample size
G	Не выявлено ассоциаций с развитием ИИ (6 исследований) No association with IS (6 studies)	Белые европейцы, 450 пациентов с ИИ или ТИА в возрасте до 60 лет, 817 человек контрольной группы [39] Caucasian, 450 patients with transitory ischemic attack or IS and 817 healthy controls [39]
		Китайцы, 366 человек с атеросклерозом сонных артерий и 200 лиц группа контроля Chinese, 366 patients with carotid atherosclerosis and 200 healthy controls
		Китайцы, 170 пациентов (114 мужчин и 56 женщин с ИИ, средний возраст = 64,1 ± 10,2 лет) [43] Chinese, 170 patients with IS (114 males and 56 females) [43]
	Не выявлено ассоциаций с атеросклеротическим поражением КА No association with CA	1400 пациентов, средний возраст 63 года [68] 1400 patients with CA [68]
rs4986791 (Thr399Ile) within the TLR4 gene		
T	↑ риск развития ИМ ↑ risk of MI	Шведы, 1213 пациентов, перенесших первый ИМ и 1561 (контрольная группа) [23] Swedish (1213 patients with MI and 1561 healthy controls) [23]
	↑ риск неблагоприятного прогноза после перенесенного ИИ ↑ risk of CVE after IS	113 пациентов с ИИ [67] 113 patients with IS [67]
	Не выявлено ассоциаций с возрастанием риска развития ИИ (4 исследования) No association with IS (4 studies)	Немцы, 769 человек с CD, с ишемией головного мозга и 139 здоровых лиц [56] German, 769 patients with IS and 139 healthy controls [56]
	Не выявлено ассоциаций с возрастанием риска развития ИИ (4 исследования) No association with IS (4 studies)	Итальянцы, 1256 пациентов [53] Italian, 1256 patients [53]
		Голландцы, 450 пациентов с ИИ или ТИА в возрасте до 60 лет, 817 человек контрольной группы [39] Netherlands, 450 patients with transitory ischemic attack or IS, 817 healthy controls [39]
		Китайцы, 366 человек с атеросклерозом сонных артерий и 200 лиц группа контроля [70] Chinese, 366 patients with carotid atherosclerosis and 200 healthy controls [70]
	Не выявлено ассоциаций с развитием ИМ (4 исследования) No association with MI (4 studies)	Немцы, 3657 с ИМ и 1211 здоровых людей (с ангиографически нормальными КА) German, 3657 patients with MI and 1211 healthy controls
		Германцы, 273 долгожителя мужчины в возрасте 95-107 лет, 606 мужчин с перенесенным ИМ в молодом возрасте и 594 человека (контрольная группа) [50] German, 273 male centenarians, 606 young males after MI, and 594 healthy controls [50]
		102 пациента с острым ИМ и 108 человек (контрольная группа) [42] 102 patients with MI and 108 healthy controls [42]
		Мексиканцы, 457 пациентов с ИМ и 283 лиц без ИМ [58] Mexican, 457 patients with MI and 283 healthy controls [58]
Не выявлено ассоциаций с развитием рестеноза стентов No association with in-stent restenosis	2682 пациентов с успешным чрескожным вмешательством [16] 2682 patients with percutaneous coronary intervention [16]	
Не выявлено ассоциаций с развитием ИБС No association with CAD	286 больных с CD типа и 413 лиц без CD и ИБС [44] 286 patients with CAD and 413 healthy controls [44]	

Таблица 1 (окончание)

Аллель Allele	Обнаруженная ассоциация Association	Популяция, объем выборки Population and sample size
rs5743708 (Arg753Gln) in TLR2 gene		
G	Ассоциирован со ↓ риска ИИ ↓ risk of IS	Россия (Забайкальский край без определения национальной принадлежности), 128 пациентов с ИИ и 113 человек группа контроля [6] Russian, 128 patients with IS and 113 healthy controls [6]
	Не выявлено ассоциаций с развитием ИМ No association with MI	Итальянцы [14] Italian [14]
	Не выявлено ассоциаций с развитием ИИ No association with IS	Китайцы, 170 пациентов с ИИ и 149 здоровых [61] Chinese, 170 patients with IS and 149 healthy controls [61]
rs3804099 (Asn199Asn) гена TLR2		
C	Не выявлено ассоциаций аллеля C с развитием ИМ No association with MI	Хорваты, 240 человек (120 с острым ИМ и 120 контрольная группа) [22] Croatian, 240 patients: 120 with MI and 120 healthy controls [22]
	Не выявлено ассоциаций аллеля C с развитием ИИ, но, он ассоциирован с тяжестью ИИ No association with IS but associated with severe IS	202 пациента с ИИ и 291 лиц (контрольная группа) [54] 202 patients with IS and 291 healthy controls [54]
rs5743810 (Ser249Pro) in TLR6 gene		
C	Аллель ассоциирован со ↓ толщины стенки левого желудочка и воспалительной реакции в артериальной стенке у женщин с гипертензией ↓ left ventricular thickness and inflammation in females with arterial hypertension	443 пациента с АГ (266 женщин и 177 мужчин) [57] 443 patients with arterial hypertension (266 females and 177 males) [57]
	Ассоциирован со ↓ риска рестеноза стентов после успешной ангиопластики, пониженным уровнем IL-6 ↓ risk of in-stent restenosis after angioplasty, and IL-6 level	207 пациентов с ИБС и 306 пациентов, перенесших операцию на сердце (300 и 305 человек контрольные группы соответственно) [25] 207 patients with CAD and 306 patients after heart surgery, with respective 300 and 305 healthy controls [25]
	Ассоциирован со ↓ риска развития ИИ Associated with ↓ IS risk	Россия (Забайкальский край без определения национальной принадлежности), 128 пациентов с ИИ и 113 человек группа контроля [6] Russian, 128 patients with IS and 113 healthy controls, ethnicity not defined [6]

Примечание. ↓↑ – снижение/увеличение, ИИ – ишемический инсульт, ИМ – инфаркт миокарда, КА – коронарные артерии, КАГ – коронарография, ССО – сосудистые осложнения, CRP – С реактивный белок, CD – сахарный диабет 2-го типа.

Note. ↓↑, decrease/increase; IS, ischemic stroke; MI, myocardial infarction; CA, coronary atherosclerosis; CVE, cardiovascular events; CRP, C-reactive protein; CAD, coronary artery disease.

В трех исследованиях показан протективный эффект минорного аллеля Ser249Pro *TLR6* в плане рестеноза стента после чрескожного коронарного вмешательства (ЧКВ), развития ОНМК, гипертрофии миокарда левого желудочка (ГЛЖ) и артериальной гипертензии (АГ) у женщин (табл. 1).

Заключение

Проведенный обзор литературы показывает, что данные по ассоциациям полиморфных вариантов генов *TLRs* с развитием атеросклероза, свя-

занных с ним ССО, малочисленны и противоречивы – один и тот же аллель являлся как аллелем риска, так и протективным аллелем для развития различных проявлений (ИМ, ОНМК, ИБС) одного и того же заболевания – атеросклероза (табл. 1), что демонстрирует методологическую и аналитическую недостаточность при изучении данных аспектов атерогенеза. Противоречивость результатов может быть связана с различными критериями формирования групп исследования, популяционной спецификой ассоциаций, различной распространенностью аллельных ва-

риантов генов и влиянием различных модифицирующих факторов (этнических, социально-экономических и экологических) [9].

Таким образом, представленный обзор литературы подтверждает участие аллельных вариантов генов TLRs в патогенезе атеросклероза и его осложнений (ИБС, развитие ИМ, ишемического инсульта). Описан множественный полиморфизм генов TLRs, однако данные о значении

большинства из вариантных генотипов при развитии ИБС и атеросклероза остаются противоречивыми.

Приведенные факты определяют актуальность дальнейших исследований, направленных на оценку ассоциаций варибельных сайтов генов TLRs с тяжестью проявлений атеросклероза и его осложнений у пациентов с ИБС в популяции русского населения Российской Федерации.

Список литературы / References

1. Барбараш О.Л., Головкин А.С., Понасенко А.В., Кутихин А.Г., Жидкова И.И., Хуторная М.В., Салахов Р.Р., Барбараш Л.С. Роль полиморфизма генов Toll-подобных рецепторов в развитии осложнений атеросклероза // Российский кардиологический журнал, 2015. № 12. С. 72-79. [Barbarash O.L., Golovkin A.S., Ponasenko A.V., Kutikhin A.G., Zhidkova I.I., Khutornaya M.V., Salakhov R.R., Barbarash L.S. The role of Toll-like receptors polymorphism in atherosclerosis complications development. *Rossiiskij kardiologicheskij zhurnal = Russian Journal of Cardiology*, 2015, no. 12, pp. 72-79. (In Russ.)]
2. Евдокимов А.В., Бурмистрова А.Л. Полиморфизм 1805T>G гена Toll-подобного рецептора 1 в популяциях русских, башкир и нагайбаков Челябинской области // Вестник Челябинского государственного университета, 2015. № 21. С. 17-22. [Evdokimov A.V., Burmistrova A.L. Toll-like receptor 1 1805T>G polymorphism in Russians, Bashkirs and Nagaibaks of the Chelyabinsk Region. *Vestnik Cheljabinskogo gosudarstvennogo universiteta = Bulletin of the Chelyabinsk State University*, 2015, no. 21, pp. 17-22. (In Russ.)]
3. Ипатова В.А., Понасенко А.В., Хуторная М.В., Цепочкина А.В., Головкин А.С. Вклад генов Toll-подобных рецепторов в этиопатогенез ишемической болезни сердца // Атеросклероз, 2014. Т. 10, № 4. С. 10-18. [Ipatova V.A., Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Tsepokina A.V., Golovkin A.S. The contribution of toll-like receptor genes in the etiopathogenesis of coronary artery disease. *Ateroskleroz = Atherosclerosis*, Vol. 10, no. 4, pp. 10-18. (In Russ.)]
4. Кайдашев И.П. NF-κB-сигнализация как основа развития системного воспаления, инсулинорезистентности, липотоксичности, сахарного диабета 2-го типа и атеросклероза // Международный эндокринологический журнал, 2011. № 3. С. 35-45. [Kaidashev I.P. NF-κB-signaling as a basis for systemic inflammation, insulinoreistance, lipotoxicity, diabetes mellitus type 2 and atherosclerosis. *Mezhdunarodnyj jendokrinologicheskij zhurnal = International Journal of Endocrinology*, 2011, no. 3, pp. 35-45. (In Russ.)]
5. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Варивода А.С., Константинова Е.В., Юдин А.А., Мастакова И.И. Роль рецепторов врожденного иммунитета в развитии острого инфаркта миокарда // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2008. № 4. С. 64-68. [Kovalchuk L.V., Khoreva M.V., Varivoda A.S., Konstantinova E.V., Judin A.A., Mastakova I.I. The role of the innate immunity receptor in the development of acute myocardial infarction. *Zhurnal mikrobiologii, jepidemiologii i immunnoboologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2008, no. 4, pp. 64-68. (In Russ.)]
6. Крохалева Ю.А., Страмбовская Н.Н., Алферова А.Е. Генетический полиморфизм toll-рецепторов у больных ишемическим инсультом в Забайкальском крае // Забайкальский медицинский вестник, 2014. № 4. С. 62-67. [Krokhaleva Yu.A., Štrambovskaja N.N., Alferova A.E. Genetic polymorphism of toll-receptors in patients with ischemic stroke in the Transbaikal region. *Zabajkalskij medicinskij vestnik = Transbaikal Medical Bulletin*, 2014, no. 4, pp. 62-67. (In Russ.)]
7. Полторац А.Н. Toll-подобные рецепторы как парадигма клетки // Journal of Biomedical Technologies, 2014. № 1. С. 52-57. [Poltorac A.N. Toll-like receptor as a paradigm of the cell. *Journal of Biomedical Technologies*, 2014, no. 1, pp. 52-57. (In Russ.)]
8. Понасенко А.В., Хуторная М.В., Кутихин А.Г., Жидкова И.И., Головкин А.С., Барбараш О.Л. Роль полиморфизмов генов семейства Toll-подобных рецепторов в атеросклеротическом поражении сосудов сердца // Атеросклероз, 2015. Т. 11, № 3. С. 22-28. [Ponasenko A.V., Khutornaya M.V., Kutikhin A.G., Zhidkova I.I., Golovkin A.S., Barbarash O.L. The role of polymorphisms within genes encoding Toll-like receptors in coronary atherosclerosis. *Ateroskleroz = Atherosclerosis*, 2015, Vol. 11, no. 3, pp. 22-28. (In Russ.)]
9. Пузырев В.П. Феномно-геномные отношения и патогенетика многофакторных заболеваний // Вестник Российской академии медицинских наук, 2011. № 9. С. 11-27. [Puzyrev V.P. Phenome-genome relations and pathogenetics of multifactorial diseases. *Vestnik Rossijskoj akademii medicinskih nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2011, no. 9, pp. 11-27. (In Russ.)]
10. Скворцова В.И., Шурдумова М.Х., Константинова Е.В. Значение Toll-подобных рецепторов в развитии ишемического повреждения // Журнал неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова, 2010. Т. 110, № 4, вып. 2: Инсульт. С. 12-17. [Skvortsova V.I., Shurdumova M.Kh., Konstantinova E.V. The significance of Toll-like receptors in the development of ischemic lesion. *Zhurnal neurologii i psikiatrii imeni S.S. Korsakov = Journal of Neurology and Psychiatry*, 2010, Vol. 110, no. 4, issue 2: Stroke, pp. 12-17. (In Russ.)]
11. Скочко О.В. Значение полиморфизма Asp299Gly Toll-подобного рецептора 4 в патогенезе атеросклероза // Журнал актуальні проблеми сучасної медицини: Вісник української медичної стоматологічної академії, 2013. Т. 13, № 2. С. 229-232. [Skochko O.V. Value of polymorphism Asp299Gly Toll-Like Receptor 4 in the pathogenesis of atherosclerosis. *Zhurnal aktualni problemi suchasnoi medicini: Visnik ukrains'koi medichnoi stomatologichnoi akademii = Journal of Actual Problems of Modern Medicine: Bulletin of the Ukrainian Medical Dental Academy*, 2013, Vol. 13, no. 2, pp. 229-232. (In Russ.)]
12. Ameziane N., Beillat T., Verpillat P., Chollet-Martin S., Aumont M.C., Seknadji P., Lamotte M., Leuret D., Ollivier V., de Prost D. Association of the Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism with acute coronary events. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2003, Vol. 23, no. 12, pp. 61-64.

13. Balistreri C.R., Candore G., Colonna-Romano G., Lio D., Caruso M., Hoffmann E., Franceschi C., Caruso C. Role of Toll-like receptor 4 in acute myocardial infarction and longevity. *JAMA*, 2004, Vol. 292, no. 19, pp. 2339-2340.
14. Balistreri C.R., Candore G., Mirabile M., Lio D., Caimi G., Incalcaterra E., Caruso M., Hoffmann E., Caruso C. TLR2 and age-related diseases: potential effects of Arg753Gln and Arg677Trp polymorphisms in acute myocardial infarction. *Rejuvenation Res.*, 2008, Vol. 11, no. 2, pp. 293-296.
15. Balistreri C.R., Colonna-Romano G., Lio, Candore G., Caruso C. TLR4 polymorphisms and ageing: implications for the pathophysiology of age-related diseases. *J. Clin. Immunol.*, 2009, Vol. 29, pp. 406-415.
16. Beijk M.A., Boekholdt S.M., Rittersma S.Z., Pons D., Zwinderman A.H., Doevendans P.A., Tio R.A., Tijssen J.G., Jukema J.W., de Winter R.J. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms show no association with the risk of clinical or angiographic restenosis after percutaneous coronary intervention. *Pharmacogenet. Genomics*, 2010, Vol. 20, no. 9, pp. 544-552.
17. Berg K.K., Madsen H.O., Garred P., Wiseth R., Gunnes S., Videm V. The additive contribution from inflammatory genetic markers on the severity of cardiovascular disease. *Scand. J. Immunol.*, 2009, Vol. 69, no. 1, pp. 36-42.
18. Boekholdt S.M., Agema W.R., Peters R.J., Zwinderman A.H., van der Wall E.E., Reitsma P.H., Kastelein J.J., Jukema J.W. Variants of toll-like receptor 4 modify the efficacy of statin therapy and the risk of cardiovascular events. *Circulation*, 2003, Vol. 107, no. 19, pp. 2416-2421.
19. Brea D., Blanco M., Ramos-Cabrer P., Moldes O., Arias S., Pérez-Mato M., Leira R., Sobrino T., Castillo J. Toll-like receptors 2 and 4 in ischemic stroke: outcome and therapeutic values. *J. Cereb. Blood Flow Meta.*, 2011, Vol. 31, no. 6, pp. 1424-1431.
20. Casanova J.L., Abel L., Quintana-Murci L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. *Annu. Rev. Immunol.*, 2011, Vol. 29, pp. 447-491.
21. Du X., Poltorak A., Wei Y., Beutler B. Three novel mammalian toll-like receptors: gene structure, expression, and evolution. *Eur. Cytokine Netw.*, 2000, Vol. 11, no. 3, pp. 362-371.
22. Džumhur A., Zibar L., Wagner J., Simundić T., Dembić Z., Barbić J. Association studies of gene polymorphisms in toll-like receptors 2 and 4 in Croatian patients with acute myocardial infarction. *Scand. J. Immunol.*, 2012, Vol. 75, no. 5, pp. 517-523.
23. Edfeldt K., Bennet A.M., Eriksson P., Frostegård J., Wiman B., Hamsten A., Hansson G.K., de Faire U., Yan Z.Q. Association of hypo-responsive toll-like receptor 4 variants with risk of myocardial infarction. *Eur. Heart J.*, 2004, Vol. 25, no. 16, pp. 1447-1453.
24. Falck-Hansen M., Kassiteridi C., Monaco C. Toll-like receptors in atherosclerosis. *Int. J. Mol. Sci.*, 2013, Vol. 14, pp. 14008-14023.
25. Hamann L., Koch A., Sur S., Hoefler N., Glaeser C., Schulz S., Gross M., Franke A., Nöthlings U., Zacharowski K., Schumann R.R. Association of a common TLR-6 polymorphism with coronary artery disease – implications for healthy ageing? *Immun. Ageing.*, 2013, Vol. 10, p. 43.
26. Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guiet C., Brière F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E.E. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immun.*, 2005, Vol. 174, no. 5, pp. 2942-2950.
27. Heffelfinger C., Pakstis A.J., Speed W.C., Clark A.P., Haigh E., Fang R., Furtado M.R., Kidd K.K., Snyder M.P. Haplotype structure and positive selection at TLR1. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2014, Vol. 22, no. 4, pp. 551-557.
28. Hernesniemi J., Lehtimäki T., Rontu R., Islam M.S., Eklund C., Mikkelsson J., Ilveskoski E., Kajander O., Goebeler S., Viiri L.E., Hurme M., Karhunen P.J. Toll-like receptor 4 polymorphism is associated with coronary stenosis but not with the occurrence of acute or old myocardial infarctions. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 2006, Vol. 66, no. 8, pp. 667-675.
29. Holloway J.W., Yang I.A., Ye S. Variation in the toll-like receptor 4 gene and susceptibility to myocardial infarction. *Pharmacogenet. Genomics*, 2005, Vol. 15, no. 1, pp. 15-21.
30. Hommels M.J., Kroon A.A., Netea M.G., de Leeuw P.W., Bruggeman C.A., Leiner T., Koster D.A., Stalenhoef A.F., van der Ven A.J. The Asp299Gly Toll-like receptor 4 polymorphism in advanced aortic atherosclerosis. *Neth. J. Med.*, 2007, Vol. 65, no. 6, pp. 203-207.
31. Incalcaterra E., Caruso M., Balistreri C.R., Candore G., Lo Presti R., Hoffmann E., Caimi G. Role of genetic polymorphisms in myocardial infarction at young age. *Clin. Hemorheol. Microcirc.*, 2010, Vol. 46, no. 4, pp. 291-298.
32. Ioana M., Ferwerda B., Plantinga T.S., Stappers M., Oosting M., McCall M., Cimpoeu A., Burada F., Panduru N., Sauerwein R., Doumbo O., van der Meer J.W., van Crevel R., Joosten L.A., Netea M.G. Different patterns of Toll-like receptor 2 polymorphisms in populations of various ethnic and geographic origins. *Infect. Immun.*, 2012, Vol. 80, no. 5, pp. 1917-1922.
33. Ionita M., Arslan F., de Kleijn D., Pasterkamp G. Endogenous inflammatory molecules engage Toll-like receptors in cardiovascular disease. *J. Innate. Immun.*, 2010, Vol. 2, no. 4, pp. 307-315.
34. Kaiser R., Tang L.F., Taylor K.E., Sterba K., Nititham J., Brown E.E., Edberg J.C., McGwin G., Alarcón G.S., Ramsey-Goldman R., Reveille J.D., Vilá L.M., Petri M., Rauch J., Miller E., Mesznik K., Kwok P.Y., Kimberly R.P., Salmon J.E., Criswell L.A. A polymorphism in TLR2 is associated with arterial thrombosis in a multiethnic population of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheumatol.*, Vol. 66, no. 7, pp. 1882-1887.
35. Kiechl S., Lorenz E., Reindl M., Wiedermann C.J., Oberhollenzer F., Bonora E., Willeit J., Schwartz D.A. Toll-like receptors 4 polymorphisms and atherogenesis. *N. Engl. J. Med.*, 2002, Vol. 347, no. 3, pp. 185-192.
36. Koch W., Hoppmann P., Pfeufer A., Schömig A., Kastrati A. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and myocardial infarction: no association in a Caucasian population. *Eur. Heart J.*, 2006, Vol. 27, no. 21, pp. 2524-2529.
37. Kolek M.J., Carlquist J.F., Muhlestein J.B., Whiting B.M., Horne B.D., Bair T.L., Anderson J.L. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism is associated with reductions in vascular inflammation, angiographic coronary artery disease, and clinical diabetes. *Amer. Heart J.*, 2004, Vol. 148, no. 6, pp. 1034-1040.
38. Kuwahata S., Fujita S., Orihara K., Hamasaki S., Oba R., Hirai H., Nagata K., Ishida S., Kataoka T., Oketani N., Ichiki H., Iriki Y., Saihara K., Okui H., Ninomiya Y., Tei C. High expression level of Toll-like receptor 2 on monocytes is an important risk factor for arteriosclerotic disease. *Atherosclerosis*, 2010, Vol. 209, no. 1, pp. 248-254.

39. Lalouschek W., Endler G., Schillinger M., Hsieh K., Lang W., Cheng S., Bauer P., Wagner O., Mannhalter C. Candidate genetic risk factors of stroke: results of a multilocus genotyping assay. *Clin Chem.*, 2007, Vol. 53, no. 4, pp. 600-605.
40. Lee C.C., Avalos A.M., Ploegh H.L. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat. Rev. Immunol.*, 2012, Vol. 12, no. 3, pp. 168-179.
41. Libby P., Okamoto Y., Rocha V.Z., Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ. J.*, 2010, Vol. 74, no. 2, pp. 213-220.
42. Lima-Neto L.G., Hirata R.D., Luchessi A.D., Silbiger V.N., Pastorelli C.P., Sampaio M.F., Armaganijan D., Rezende A.A., Doi S.Q., Hirata M.H. Detection of the TLR4 1196C>T polymorphism by mismatched-polymerase chain reaction using plasmid DNA as internal control in restriction fragment length polymorphism assays. *Genet. Test Mol. Biomarkers*, 2009, Vol. 13, no. 3, pp. 343-347.
43. Lin Y.C., Chang Y.M., Yu J.M., Lin Y.C., Chang Y.M., Yu J.M., Yen J.H., Chang J.G., Hu C.J. Toll-like receptor 4 gene C119A but not Asp299Gly polymorphism is associated with ischemic stroke among ethnic Chinese in Taiwan. *Atherosclerosis*, 2005, Vol. 180, no. 2, pp. 305-309.
44. Manolakis A.C., Kapsoritakis A.N., Tiaka E.K., Sidiropoulos A., Gerovassili A., Satra M., Vamvakopoulou D., Tsiopoulos F., Papanas N., Skoularigis I., Potamianos S.P., Vamvakopoulos N. TLR4 gene polymorphisms: evidence for protection against type 2 diabetes but not for diabetes-associated ischaemic heart disease. *Eur. J. Endocrinol.*, 2011, Vol. 165, no. 2, pp. 261-267.
45. Martínez-Ríos M.A., Vargas-Alarcón G., Vallejo M., Cruz-Martínez E., Pérez-Méndez O., Medina-Andrade Á., De la Torre-García M., Peña-Duque M.A., Fragoso J.M. Toll-like receptor 4 gene polymorphisms and acute coronary syndrome: no association in a Mexican population. *Arch. Cardiol. Mex.*, 2013, Vol. 83, no. 4, pp. 257-262.
46. McCarthy C.G., Goulopoulou S., Wenceslau C.F., Spitler K., Matsumoto T., Webb R.C. Toll-like receptors and damage-associated molecular patterns: novel links between inflammation and hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2014, Vol. 306, no. 2, pp. 184-196.
47. McGettrick A. F., O'Neill L. Localisation and trafficking of Toll-like receptors: an important mode of regulation. *Curr. Opin. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 1, pp. 20-27.
48. Mikacenic C., Reiner A.P., Holden T.D., Nickerson D.A., Wurfel M.M. Variation in the TLR10/TLR1/TLR6 locus is the major genetic determinant of interindividual difference in TLR1/2-mediated responses. *Genes Immun.*, 2013, Vol. 14, no. 1, pp. 52-57.
49. Morange P.E., Tiret L., Saut N., Luc G., Arveiler D., Ferrieres J., Amouyel P., Evans A., Ducimetiere P., Cambien F., Juhan-Vague I. TLR4/Asp299Gly, CD14/C-260T, plasma levels of the soluble receptor CD14 and the risk of coronary heart disease: The PRIME Study. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2004, Vol. 12, no. 12, pp. 1041-1049.
50. Nebel A., Flachsbarth F., Schafer A., Nothnagel M., Nikolaus S., Mokhtari N.E., Schreiber S. Role of the toll-like receptor 4 polymorphism Asp299Gly in longevity and myocardial infarction in German men. *Mech. Ageing Dev.*, 2007, Vol. 128, no. 5-6, pp. 409-411.
51. Netea M.G., Hijmans A., van Wissen S., Smilde T.J., Trip M.D., Kullberg B.J., de Boo T., van der Meer J.W., Kastelein J.J., Stalenhoef A.F. Toll-like receptor-4 Asp299Gly polymorphism does not influence progression of atherosclerosis in patients with familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Clin. Invest.*, 2004, Vol. 34, no. 2, pp. 94-99.
52. Newton K., Dixit V.M. Signaling in innate immunity and inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, 2012, Vol. 4, no. 3. pii: a006049. doi: 10.1101/cshperspect.a006049.
53. Norata G.D., Garlaschelli K., Ongari M., Raselli S., Grigore L., Benvenuto F., Maggi F.M., Catapano A.L. Effect of the Toll-like receptor 4 (TLR-4) variants on intima-media thickness and monocyte-derived macrophage response to LPS. *J. Intern. Med.*, 2005, Vol. 258, no. 1, pp. 21-27.
54. Park H.J., Kim S.K., Yun D.H., Kim D.H., Chon J., Kim J.W., Chung J.H. Association of toll-like receptor 2 polymorphisms with National Institute of Health Stroke Scale scores of ischemic stroke patients. *J. Mol. Neurosci.*, 2012, Vol. 46, no. 3, pp. 536-540.
55. Qian C., Cao X. Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 2013, Vol. 1283, pp. 67-74.
56. Reismann P., Lichy C., Rudofsky G., Humpert P.M., Genius J., Si T.D., Dörfer C., Grau A.J., Hamann A., Hacke W., Nawroth P.P., Bierhaus A. Lack of association between polymorphisms of the toll-like receptor 4 gene and cerebral ischemia. *J. Neurol.*, 2004, Vol. 251, no. 7, pp. 853-858.
57. Sales M.L., Schreiber R., Ferreira-Sae M.C., Fernandes M.N., Piveta C.S., Cipolli J.A., Cardoso C.C., Matos-Souza J.R., Geloneze B., Franchini K.G., Nadruz W. Toll-like receptor 6 Ser249Pro polymorphism is associated with lower left ventricular wall thickness and inflammatory response in hypertensive women. *Am. J. Hypertens.*, 2010, Vol. 23, no. 6, pp. 649-654.
58. Seneviratne A.N., Sivagurunathan B., Monaco C. Toll-like receptors and macrophage activation in atherosclerosis. *Clin. Chim. Acta*, 2012, Vol. 413, no. 1-2, pp. 3-14.
59. Sheu J.J., Chang L.T., Chiang C.H., Youssef A.A., Wu C.J., Lee F.Y., Yip H.K. Prognostic value of activated toll-like receptor-4 in monocytes following acute myocardial infarction. *Int. Heart J.*, 2008, Vol. 49, no. 1, pp. 1-11.
60. Sollinger D., Eißler R., Lorenz S., Strand S., Chmielewski S., Aouqui C., Schmaderer C., Bluysen H., Zicha J., Witzke O., Scherer E., Lutz J., Heemann U., Baumann M. Damage-associated molecular pattern activated Toll-like receptor 4 signaling modulates blood pressure in L-NAME-induced hypertension. *Cardiovasc. Res.*, 2014, Vol. 101, no. 3, pp. 464-472.
61. Song Y., Liu H., Long L., Zhang N., Liu Y. TLR4 rs1927911, but not TLR2 rs5743708, is associated with atherosclerotic cerebral infarction in the Southern Han Population: a case-control study. *Medicine (Baltimore)*, 2015, Vol. 94, no. 2, e381. doi: 10.1097/MD.0000000000000381.
62. Thompson C.M., Holden T.D., Rona G., Laxmanan B., Black R.A., O'Keefe G.E., Wurfel M.M. Toll-like receptor 1 polymorphisms and associated outcomes in sepsis after traumatic injury: a candidate gene association study. *Ann. Surg.*, 2014, Vol. 259, no. 1, pp. 179-185.

63. Tieri P, Termanini A., Bellavista E., Salvioli S., Capri M., Franceschi C. Charting the NF- κ B pathway interactome map. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 3, e32678. doi: 10.1371/journal.pone.0032678.
64. Trivedi S., Greidinger E.L. Endosomal Toll-like receptors in autoimmunity: mechanisms for clinical diversity. *Therapy*, 2009, Vol. 6, no. 3, pp. 433-442.
65. Vallejo J.G. Role of toll-like receptors in cardiovascular diseases. *Clin. Sci. (Lond.)*, 2011, Vol. 121, no. 1, pp. 1-10.
66. 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.
67. Weinstein J.R., Schulze J., Lee R.V., Phillips H., Zierath D., Tanzi P., Shibata D., Cain K.C., Becker K.J. Functional polymorphisms in toll-like receptor 4 are associated with worse outcome in acute ischemic stroke patients. *Neuroreport*, 2014, Vol. 25, no. 8, pp. 580-584.
68. Yang I. A., Holloway J.W., Ye S. TLR4 Asp 299Gly polymorphism is not associated with coronary artery stenosis. *Atherosclerosis*, 2003, Vol. 170, no. 1, pp. 187-190.
69. Yin Y.W., Sun Q.Q., Hu A.M., Liu H.L., Wang Q., Zhang B.B. Toll-like receptor 4 gene Asp299Gly polymorphism in myocardial infarction: a meta-analysis of 15,148 subjects. *Hum. Immunol.*, 2014, Vol. 75, no. 2, pp. 163-169.
70. Yuan M., Xia J., Ma L., Xiao B., Yang Q. Lack of the Toll-Like Receptor 4 Gene Polymorphisms Asp299Gly and Thr399Ile in a Chinese Population. *Int. J. Neurosci.*, 2010, Vol. 120, no. 6, pp. 415-420.
71. Zee R.Y., Hegener H.H., Gould J., Ridker P.M. Toll-like receptor 4 Asp299Gly gene polymorphism and risk of atherothrombosis. *Stroke*, 2005, Vol. 36, no. 1, pp. 154-157.
72. Zhang K., Zhou B., Wang Y., Song Y., Rao L., Zhang L. Lack of association between TLR4 Asp299Gly polymorphism and atherosclerosis: evidence from meta-analysis. *Thromb. Res.*, 2012, Vol. 130, no. 4, pp. 203-208.
73. Zhang Y., Jiang T., Yang X., Xue Y., Wang C., Liu J., Zhang X., Chen Z., Zhao M., Li J.-C. Toll-like receptor -1, -2, and -6 polymorphisms and pulmonary tuberculosis susceptibility: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 5, e63357. doi: 10.1371/journal.pone.0063357.
74. Zhu X., Bagchi A., Zhao H., Kirschning C.J., Hajjar R.J., Chao W., Hellman J., Schmidt U. Toll-like receptor 2 activation by bacterial peptidoglycan-associated lipoprotein activates cardiomyocyte inflammation and contractile dysfunction. *Crit. Care Med.*, 2007, Vol. 35, no. 3, pp. 886-892.
75. Ziakas P.D., Prodromou M.L., El Khoury J., Zintzaras E., Mylonakis E. The role of TLR4 896 A>G and 1196 C>T in susceptibility to infections: a review and meta-analysis of genetic association studies. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 11, e81047. doi: 10.1371/journal.pone.0081047.

Авторы:

Жидкова И.И. — к.м.н., врач-кардиолог, научный сотрудник лаборатории патологии кровообращения ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Понасенко А.В. — к.м.н., заведующая лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Хуторная М.В. — младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Кутихин А.Г. — к.м.н., младший научный сотрудник лаборатории геномной медицины отдела экспериментальной и клинической кардиологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия

Барбараш О.Л. — д.м.н., профессор, директор ФГБНУ «Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний», г. Кемерово, Россия; ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Кемерово, Россия

Authors:

Zhidkova I.I., PhD (Medicine), Clinical Cardiologist, Research Associate, Laboratory of Circulation Pathology, Division of Polyvascular Disease, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Ponassenko A.V., PhD (Medicine), Head, Laboratory for Genomic Medicine, Division of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Khutornaya M.V., Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Kutikhin A.G., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Laboratory of Genomic Medicine, Department of Experimental and Clinical Cardiology, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo, Russian Federation

Barbarash O.L., PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases; Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russian Federation

Поступила 06.09.2016
Отправлена на доработку 07.09.2016
Принята к печати 28.09.2016

Received 06.09.2016
Revision received 07.09.2016
Accepted 28.09.2016

ИНТЕРФЕРОН-АЛЬФА-ИНДУЦИРОВАННЫЕ ДЕНДРИТНЫЕ КЛЕТКИ У БОЛЬНЫХ РЕВМАТОИДНЫМ АРТРИТОМ И ИХ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ К ДЕКСАМЕТАЗОНУ

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

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

Резюме. Дендритные клетки (ДК) играют важную роль в патогенезе ревматоидного артрита (РА) и рассматриваются в качестве новых мишеней терапевтических воздействий. Известно, что при воспалении тканевые ДК нелимфоидных органов могут дифференцироваться из моноцитов. При этом важная роль в дифференцировке и активации ДК при РА, отводится интерферону-альфа. Целью работы является изучение фенотипических и функциональных свойств ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии интерферона-альфа (IFN-ДК) у больных РА и оценка их чувствительности к толерогенному действию дексаметазона. В исследование были включены 14 больных РА с умеренной или высокой активностью заболевания, получавших терапию болезнью-модифицирующими препаратами. Контролем служили 20 сопоставимых по полу и возрасту доноров крови. IFN-ДК генерировали из моноцитов путем культивирования адгезивной к пластику фракции мононуклеарных клеток с GM-CSF и IFN α в отсутствие или присутствии дексаметазона (10^{-6} М). IFN-ДК больных РА отличались повышенным содержанием CD14⁺CD83⁻ и сниженным содержанием CD14⁺CD83⁺ клеток, что свидетельствует о задержке созревания ДК. Кроме того, IFN-ДК пациентов характеризовались более высокой экспрессией B7-H1 и TLR2. Фенотипические изменения не оказывали значимого влияния на функциональную активность ДК, в частности их способность продуцировать TNF α , IL-10 и IL-6, стимулировать пролиферацию аллогенных Т-клеток и индуцировать Т-клетки к продукции Th1- и Th2-цитокинов. Генерация ДК в присутствии дексаметазона у больных РА приводила к снижению экспрессии CD83 и CD86, подавлению продукции TNF α и ингибиции аллостимуляторной активности IFN-ДК. Кроме того, дексаметазон угнетал способность ДК активировать Т-клетки к продукции Th1-цитокинов, смещая баланс в сторону Th2-стимулирующей активности. Полученные данные свидетельствуют, что IFN-ДК больных РА сохраняют чувствительность к толерогенному действию дексаметазона. При этом выявленная гетерогенность больных по чувствительности ДК к ингибирующему эффекту дексаметазона может представлять интерес в прогностическом аспекте при проведении пульс-терапии глюкокортикоидами. Полученные результаты также обосновывают возможность использования IFN-ДК в качестве новой клеточной платформы при получении ДК с толерогенными свойствами.

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

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

Kurochkina Yuliya D.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yadrinsevskaya str., 14.
Phone: 7 (383) 236-03-29.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: ct_lab@mail.ru; juli_k@bk.ru

Образец цитирования:

Е.Р. Черных, Ю.Д. Курочкина, О.Ю. Леплина, М.А. Тихонова, Т.В. Тыринова, А.Э. Сизиков, О.А. Чумасова, А.А. Останин «Интерферон-альфа-индуцированные дендритные клетки у больных ревматоидным артритом и их чувствительность к дексаметазону» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 255–266.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-255-266

© Черных Е.Р. и соавт., 2017

For citation:

E.R. Chernykh, Yu.D. Kurochkina, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova, T.V. Tyrinova, A.E. Sizikov, O.A. Chumasova, A.A. Ostanin "IFN α -induced dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis and their sensitivity to dexamethasone", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 255–266.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-255-266

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-255-266

IFN α -INDUCED DENDRITIC CELLS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS AND THEIR SENSITIVITY TO DEXAMETHASONE

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

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

Abstract. Dendritic cells (DCs) play an important role in pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA) and are considered a novel target for immune therapy. Under inflammatory conditions, local dendritic cells of non-lymphoid organs are thought to be differentiated from monocytes. Moreover, DCs differentiation and activation in RA may be largely controlled by interferon-alpha. The aim of the present study was to investigate phenotypic and functional properties of monocyte-derived DCs generated in the presence of interferon-alpha (IFN-DCs) in RA patients, and to specify, whether IFN-DCs are sensitive to a tolerogenic effect of dexamethasone. Fourteen RA patients with moderate-to-high disease activity treated with disease-modifying drugs have been included into the study. Twenty sex- and age-related healthy donors were used as a control. IFN-DCs were generated from monocytes by culturing adherent fraction of mononuclear cells for 5 days with GM-CSF and IFN α in the absence or presence of dexamethasone (10^{-6} M). IFN-DCs from RA patients were characterized by increased numbers of CD14⁺CD83⁻ and lower amounts of CD14⁻CD83⁺ cells, thus presuming a delayed maturation. Furthermore, IFN-DCs from patients were characterized by higher expression of B7-H1 and TLR2. The phenotypic changes did not significantly influence specific functional activities of DCs, in particular, the capacity of DCs to produce TNF α , IL-10, IL-6, to stimulate proliferation of allogeneic T-cells and to activate T-cells for Th1 and Th2 cytokine production. Generation of patients' DCs in presence of dexamethasone caused a decrease in CD83 and CD86 expression, reduced TNF α production, and suppressed allostimulatory activity of the DCs. Moreover, dexamethasone inhibited the ability of DC to stimulate Th1 response, along with shifting the balance towards Th2-stimulating activity. The data obtained provide an evidence that IFN-DCs from RA patients remain sensitive to the tolerogenic effects of dexamethasone. Furthermore, the revealed variations in sensitivity of patient's DCs to dexamethasone-mediated inhibitory effect may be of interest for prediction of therapeutic response to glucocorticoid therapy. Our results also provide an evidence for possible implementation of IFN-DCs as a new cell platform for obtaining tolerogenic DCs.

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

Введение

Основной патогенеза ревматоидного артрита (РА) является воспалительный аутоиммунный процесс, направленный против антигенов синовиальной оболочки суставов. Поскольку запуск и поддержание аутоиммунных реакций связаны с патологической презентацией собственных антигенов, важная роль в патогенезе РА отводится дендритным клеткам (ДК). ДК способны презентировать антигенспецифическим Т-лимфоцитам человеческий хрящевой гликопротеин [37], а также продуцировать провоспалительные цитокины [38]. И хотя вопрос о причастности ДК к возникновению РА остается открытым, вовлечение этих клеток в поддержание аутоиммунного процесса за счет активации Th1- и Th17-клеток и подавления генерации регуляторных Т-клеток (Treg) находит все больше подтверждений [14, 16].

У больных РА в синовиальной ткани и жидкости выявляется достаточно большое количество ДК, часто локализованных в центре Т-клеточных кластеров [35]. Эти ДК имеют зрелый активированный фенотип, экспрессируют МНС II класса, костимуляторные молекулы, молекулы адгезии, хемокиновые рецепторы и стимулируют преимущественно Th1/провоспалительный ответ. Присутствие в синовиальной жидкости/ткани активированных ДК может быть обусловлено их миграцией из циркуляции и активацией под действием содержащихся в синовиальной жидкости цитокинов (IL-1, IL-6, TNF α , GM-CSF, IL-8) и коллагена [5, 6, 24, 33]. Кроме того, ДК могут дифференцироваться из локализованных в синовиальной ткани ранних миелоидных предшественников [31].

Важно отметить, что существенным источником тканевых ДК в нелимфоидных органах являются моноциты [25]. Культивирование мо-

ноцитов *in vitro* с GM-CSF и IL-4 приводит к генерации ДК (IL4-ДК), которые у больных РА обладают сходством с тканевыми ДК [35]. Исследования ДК моноцитарного происхождения у больных РА показали, что IL4-ДК отличаются повышенной продукцией Th1/провоспалительных цитокинов и хемокинов [26, 27, 28]. С другой стороны, обнаружено, что в отличие от доноров IL4-ДК больных проявляют резистентность к некоторым ингибиторным сигналам [26].

Наряду с IL-4 мощными индукторами созревания моноцитов в ДК являются интерфероны I типа [9]. Уровень интерферонов I типа (IFN α , IFN β) при аутоиммунной патологии повышен [29, 30]. Поскольку при РА отмечается низкое содержание IL-4 в синовиальной жидкости и сыворотке крови [5, 20], созревание моноцитов в ДК может в значительной степени контролироваться IFN α . Тем не менее, свойства IFN α -индуцированных ДК (IFN-ДК) у больных РА не охарактеризованы. Учитывая, что ДК являются мишенями терапевтических воздействий у больных РА, важным вопросом является также оценка чувствительности IFN-ДК к действию глюкокортикоидов, входящих в стандарты лечения РА и обладающих способностью индуцировать толерогенный фенотип ДК. Таким образом, целью работы явилось изучение у больных РА фенотипических и функциональных свойств ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN α , и оценка их чувствительности к толерогенному действию дексаметазона.

Материалы и методы

В исследование были включены 14 пациентов с РА: 12 женщин и 2 мужчин в возрасте от 32 до 68 лет (медиана 54 года) и 20 сопоставимых по полу и возрасту здоровых доноров. Диагностика РА проводилась в соответствии с критериями Американской коллегии ревматологов (ACR/EULAR, 2010). На момент включения в исследование давность заболевания составляла в среднем 69 мес. Все пациенты получали лечение болезнью-модифицирующими препаратами в виде монотерапии или в сочетании с нестероидными противовоспалительными препаратами и имели умеренную или высокую активность заболевания (медиана DAS28 составляла 5,5). Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия.

Венозную кровь забирали в вакутейнерные пробирки с гепарином (Becton Dickinson). Мононуклеарные клетки (МНК) из венозной крови выделяли методом градиентного центрифугирования на фиколле-верографине. Далее клетки 2-кратно отмывали и для получения фракции

адгезивных клеток инкубировали в 6-луночных пластиковых планшетах (Nunclon, Дания) в течение 1 часа в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 5% сыворотки плодов коровы (FCS, БиолоТ, Санкт-Петербург). Неприлипающую к пластику фракцию МНК далее удаляли, а адгезивные клетки (90-94% CD14⁺ моноциты) продолжали культивировать при 37 °С в CO₂-инкубаторе в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария). Для индукции созревания ДК на 4 сутки вносили липополисахарид (LPS, 10 мкг/мл, LPS E.colli0114:B4, Sigma-Aldrich) и продолжали культивирование в течение последующих 24 часов. Генерацию IFN-ДК проводили в отсутствие (контрольные культуры) и в присутствии дексаметазона (10⁻⁶ М), который добавляли на 3 сутки.

Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACSCalibur, Becton Dickinson, США) с использованием FITC- или PE-меченных моноклональных анти-CD14, -CD83, -CD86, -HLA-DR, -TLR-2, -B7H1 антител (BD PharMingen, США). Оценивали относительное количество позитивных клеток, а также уровень экспрессии поверхностных маркеров по средней интенсивности флуоресценции (СИФ).

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

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

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

Th1- (IFN γ) и Th2- (IL-6) цитокинов методом ИФА.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета программ Statistica 6.0. Данные представлены в виде медианных значений (Me), квартильного диапазона (25-75% квартили) и диапазона минимальных и максимальных значений. Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрические критерии: U-критерий Манна–Уитни и W-критерий Вилкоксона для парных выборок. Корреляционный анализ проводили с помощью ранговой корреляции Спирмена (Rs). Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Как видно из данных таблицы 1, у здоровых доноров LPS-активированные ДК, генерируемые из моноцитов в присутствии IFN α , характеризуются промежуточной степенью зрелости. Об этом свидетельствует сохраняющаяся экспрессия CD14 в сочетании с достаточно высокой экспрессией костимуляторных молекул (CD86) и HLA-DR антигенов, а также наличие на части IFN-ДК маркера зрелости CD83, что согласуется с данными литературы [9]. Генерируемые *in vitro* IFN-ДК больных РА отличаются 2-кратным увеличением относительного содержания CD14⁺ клеток и уровня экспрессии на них данного маркера, а так же достоверным снижением количества CD83⁺ клеток.

Одновременная оценка экспрессии CD14 и CD83 молекул на IFN-ДК доноров показала, что преобладающая часть CD14⁺ клеток не несет CD83, также как и основная часть CD83⁺ клеток не экспрессирует CD14. Соответственно, ДК с коэкспрессией CD14 и CD83 представляют минорную субпопуляцию (Me 5,5%). Среди IFN-ДК больных РА количество CD14⁺CD83⁺ также составляет в среднем 5,0%, тогда как относительное содержание CD14⁺CD83⁻ клеток достигает 60% (против 21% у доноров, $p_U = 0,01$), а количество CD14⁻CD83⁺ клеток достоверно снижено, что свидетельствует о нарушении дифференцировки/созревания ДК.

По сравнению с донорами IFN-ДК больных РА отличаются также повышенным содержанием клеток, экспрессирующих маркеры, ассоциированные с толерогенной активностью: TLR-2 и B7-H1 (PD-1L). Причем в отношении B7-H1⁺ клеток различия были статистически значимы. Вместе с тем по экспрессии маркеров, участвующих в костимуляции и антигенной презентации (CD86 и HLA-DR), IFN-ДК больных и доноров были сопоставимы между собой.

Чтобы выяснить, насколько изменения фенотипа сказываются на функциональной активности ДК, далее были исследованы цитокин-секреторная и аллостимуляторная активность IFN-ДК, а также их способность индуцировать Т-клетки к продукции Th1- и Th2-цитокинов в алло-СКЛ.

ТАБЛИЦА 1. ФЕНОТИП IFN-ДК БОЛЬНЫХ РА И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ
TABLE 1. PHENOTYPE OF IFN-DCs FROM RA PATIENTS AND HEALTHY DONORS

Маркер Cell marker	Количество клеток (%) Cell count (%)		P_U	СИФ (фл. ед.) MFI (fl. units)		P_U
	Доноры Donors (n = 13)	Больные РА RA patients (n = 10)		Доноры Donors (n = 13)	Больные РА RA patients (n = 10)	
CD14 ⁺	34 (15-51)	65 (44-81)	0,008	52 (45-66)	98 (67-167)	0,01
CD83 ⁺	16 (12-20)	8,5 (6-23)	0,037	52 (23-93)	42 (29-61)	0,87
CD14 ⁺ CD83 ⁻	21 (9-43)	60 (30-76)	0,01			
CD14 ⁻ CD83 ⁺	5,5 (3-11)	5,0 (5-14)	0,58			
CD14 ⁺ CD83 ⁺	9,5 (8-17)	3,0 (0,3-6)	0,002			
CD86 ⁺	60 (16-74)	49 (39-70)	0,82	86 (67-145)	86 (68-158)	0,79
HLA-DR ⁺	77 (72-91)	75 (60-81)	0,43	135 (61-511)	129 (62-334)	0,9
TLR2 ⁺	35 (12-51)	51 (27-73)	0,3	71 (36-106)	57 (38-80)	0,82
B7-H1 ⁺	57 (39-64)	77 (56-84)	0,04	109 (41-127)	66 (35-92)	0,2

Примечание. Процент позитивных клеток и средняя интенсивность флюоресценции поверхностных маркеров представлены в виде медианных значений. В скобках – интерквартильный диапазон. p_U – критерий Манна–Уитни.

Note. Percentage of positive cells and mean fluorescence intensity of surface markers are presented as median values, interquartile range shown in brackets. P_U , Mann–Whitney U-test.

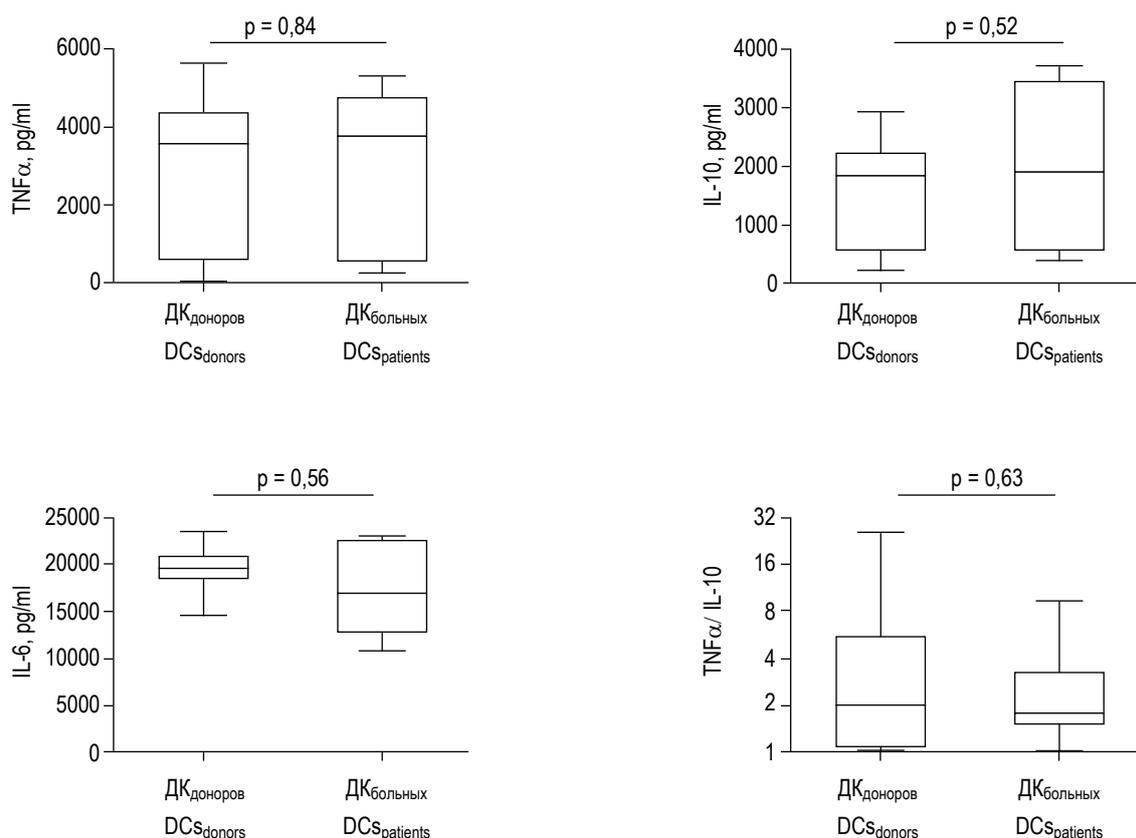


Рисунок 1. Продукция цитокинов IFN-ДК доноров (n = 9) и больных РА (n = 5)

Примечание. Данные по продукции цитокинов (пкг/мл), также индекс соотношения TNFα/IL-10 (расч. ед.) представлены в виде медиан (сплошная горизонтальная линия), интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений. p – U-критерий Манна-Уитни.

Figure 1. Cytokine production by IFN-DCs from healthy donors (n = 9) and RA patients (n = 5)

Note. Data on cytokine production (pg/mL), and TNFα/IL-10 ratio (estim. units) are presented as a median (solid horizontal line), interquartile ranges, minimal and maximal values. P values were determined by the Mann-Whitney U-test.

Оценка содержания про- и противовоспалительных цитокинов в супернатантах культур IFN-ДК доноров и больных РА показала, что IFN-ДК больных продуцируют схожие уровни TNFα, IL-6 и IL-10 и не отличаются от доноров по соотношению TNFα/IL-10 (рис. 1). При этом следует отметить, что больные РА были сопоставимы с донорами по количеству генерируемых ДК ($0,08 \times 10^6/1$ млн МНК для здоровых доноров и $0,10 \times 10^6/1$ млн МНК для больных РА, $p_U = 0,3$).

Способность ДК стимулировать пролиферативный ответ Т-лимфоцитов на аллоантигены в СКЛ может рассматриваться в качестве интегрального показателя их функциональной активности. Из данных, представленных на рисунке 2, видно, что в целом по группе обследованных больных РА уровень индуцированной пролиферации в алло-СКЛ и индексы влияния IFN-ДК значимо не отличаются от значений здоровых

доноров ($p_U = 0,28$ и $0,57$ соответственно). Тем не менее, в 44% случаев (4/9 больных РА) аллостимуляторная активность IFN-ДК была снижена (пролиферативный ответ Т-клеток в алло-СКЛ выходил за границу нормативного квартильного диапазона). Корреляционный анализ выявил наличие прямой взаимосвязи между аллостимуляторной активностью IFN-ДК и содержанием CD83⁺ клеток ($r_s = 0,7$; $p = 0,004$). В то же время показатели пролиферации в алло-СКЛ и ИВ_{ДК} обратно коррелировали с количеством TLR2⁺ клеток ($r_s = -0,54$; $p = 0,07$ и $-0,61$; $p = 0,036$ соответственно). С этой точки зрения сниженная аллостимуляторная активность IFN-ДК у части больных может объясняться уменьшением относительного количества CD83⁺ и возрастанием доли TLR2⁺ клеток.

Чтобы выяснить, отличаются ли IFN-ДК больных РА по способности активировать Th1-

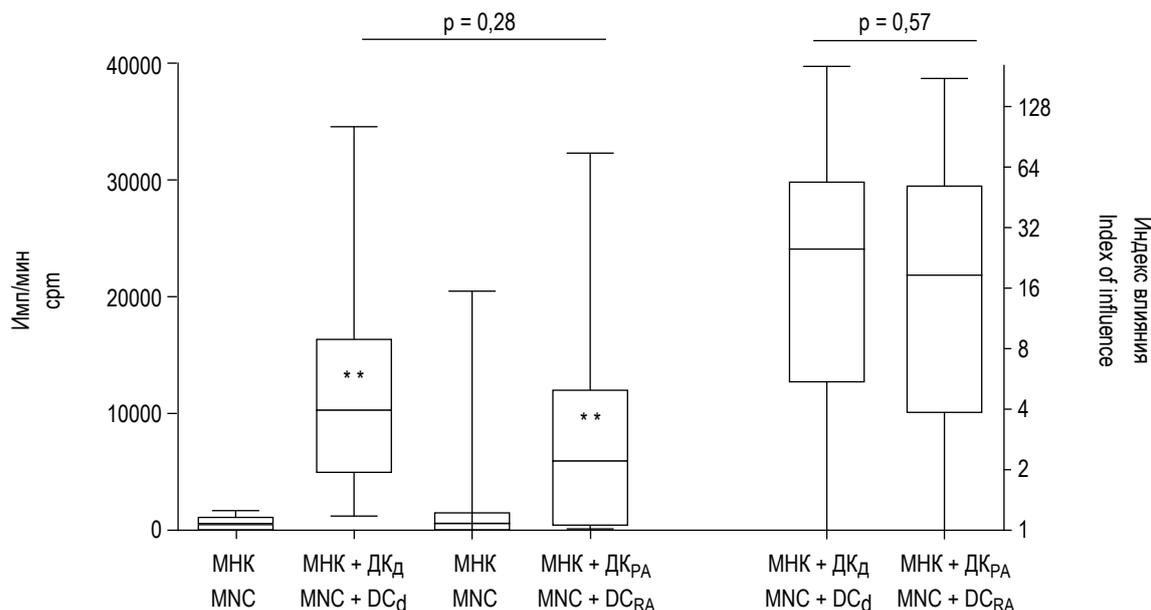


Рисунок 2. Стимуляторная активность IFN-ДК доноров (n = 10) и больных РА (n = 9) в алло-СКЛ

Примечание. Данные по пролиферации (имп/мин) МНК в отсутствие IFN-ДК (МНК), а также в присутствии аллогенных IFN-ДК здоровых доноров (МНК + ДКД) и больных РА (МНК + ДКРА) представлены в виде медиан (сплошная горизонтальная линия), интерквартильного диапазона, диапазона минимальных и максимальных значений. По правой оси ординат представлены индексы влияния (расч. ед.) IFN-ДК в алло-СКЛ. ** – $p < 0,01$ – достоверность различия с пролиферацией МНК в отсутствие IFN-ДК (U-критерий Манна–Уитни).

Figure 2. Stimulatory activity of IFN-DCs from healthy donors (n = 10) and RA patients (n = 9) in allo-MLC

Note. The data on MNC proliferation (cpm) in the absence of IFN-DCs (MNC), as well as in presence of allogeneic IFN-DCs from healthy donors (MNC + DCD) and RA patients (MNC + DCRA) are presented as medians (solid horizontal line), interquartile range, minimal and maximal values. On the right hand, Y axis represents the influence index (estim. units) of IFN-DCs in allo-MLC test. **, $P < 0.01$, the differences are statistically significant versus MNC proliferation in the absence of IFN-DCs (Mann–Whitney U-test).

и Th2-клетки, было исследовано содержание Th1- (IFN γ) и Th2- (IL-6) цитокинов в супернатантах 5-суточной алло-СКЛ, индуцированной ДК доноров и больных РА (табл. 2). IFN-ДК доноров эффективно стимулировали продукцию как Th1-, так и Th2-цитокинов, что проявлялось возрастанием уровня IFN γ (в среднем с 10 до 1280 пкг/мл, $p_U < 0,001$) и IL-6 (в среднем с 230 до 9920 пкг/мл, $p_U < 0,001$) по сравнению с культурами МНК в отсутствие ДК. Медианные значения индексов влияния ДК для IFN γ и IL-6 составляли, соответственно, 134 и 42 расч. ед., свидетельствуя о более выраженной Th1-стимулирующей активности IFN-ДК здоровых доноров ($p_w = 0,017$). IFN-ДК больных РА также эффективно стимулировали секрецию Th1-/Th2-цитокинов в алло-СКЛ, поскольку индексы влияния ДК больных на продукцию IFN γ и IL-6 значимо не отличались от донорских значений. Тем не менее, средний уровень определяемых цитокинов был несколько ниже: 960 против 1280 пкг/мл для IFN γ

(↓ на 25%, $p_U = 0,87$) и 8560 против 9920 пкг/мл для IL-6 (↓ на 14%, $p_U = 0,053$). Но поскольку индекс влияния ДК больных РА на продукцию IFN γ почти в 3 раза превышал таковой для IL-6 (101 против 37 расч.ед., $p_w = 0,015$), можно заключить, что IFN-ДК у больных РА, так же как и у здоровых доноров, характеризовались преобладающей Th1-стимулирующей активностью.

Ранее нами было показано, что, подобно ДК, генерируемым в присутствии IL-4, IFN-ДК под действием глюкокортикоидов приобретают толерогенные свойства [1]. Чтобы оценить чувствительность ДК больных РА к действию дексаметазона, на завершающем этапе исследовали влияние дексаметазона на фенотип и функциональную активность IFN-ДК пациентов (табл. 3). Дексаметазон-модифицированные IFN-ДК (ДК_{DEX}) отличались от интактных клеток (ДК_{ИНТ}) достоверным снижением относительного содержания CD83⁺ клеток и выраженным трендом к снижению доли CD86⁺ клеток ($p_w = 0,07$). В попу-

ТАБЛИЦА 2. СПОСОБНОСТЬ IFN-ДК БОЛЬНЫХ РА АКТИВИРОВАТЬ Т-КЛЕТКИ К ПРОДУКЦИИ Th1- И Th2-ЦИТОКИНОВ В АЛЛО-СКЛ

TABLE 2. ABILITY OF IFN-DCs FROM RA PATIENTS TO ACTIVATE T CELLS FOR Th1 AND Th2 CYTOKINE PRODUCTION IN ALLO-MLC

Цитокин Cytokine	Продукция цитокинов в алло-СКЛ (пг/мл) Cytokine production in allo-MLC (pg/mL)		p _U	Индекс влияния (расч. ед) Influence index (estim. units)		p _U
	IFN-ДК доноров IFN-DCs from donors	IFN-ДК больных РА IFN-DCs from RA patients		IFN-ДК доноров IFN-DCs from donors	IFN-ДК больных РА IFN-DCs from RA patients	
IFN γ	1280 (710-1500)	960 (590-1740)	0,87	134 (75-158)	101 (62-182)	0,45
IL-6	9920 (9280-10690)	8560 (6780-9280)	0,053	42 (39-46)	37 (29-40)	0,62

Примечание. МНК культивировали в присутствии аллогенных IFN-ДК здоровых доноров (n = 13) и больных РА (n = 12). Концентрацию IFN γ и IL-6 в 5-суточных супернатантах алло-СКЛ оценивали с помощью ИФА. Данные представлены в виде медианных значений и интерквартильного диапазона (в скобках). p_U – U-критерий Манна–Уитни.

Note. MNC were cultured over 5 days in presence of allogeneic IFN-DCs from healthy donors (n = 13) and patients with RA (n = 12). IFN γ and IL-6 concentrations in allo-MLC supernates were measured by ELISA technique. The data are presented as median values and interquartile ranges (in brackets). P, Mann–Whitney U-test.

ляции ДК_{DEX} было также повышено количество CD14⁺ и TLR2⁺ клеток, однако эти изменения не были статистически значимы. Экспрессия B7-H1 и HLA-DR молекул под действием дексаметазона не менялась.

Дексаметазон оказывал заметный эффект на цитокин-секреторную и аллостимуляторную активность IFN-ДК больных РА. Так, под влиянием дексаметазона снижалась способность ДК продуцировать провоспалительные цитокины: TNF α в 7 раз (с 3780 до 510 пкг/мл, p_w = 0,007) и IL-6 в 1,7 раза (с 16960 до 9900 пкг/мл, p_w = 0,07). Однако характер продукции IL-10 при этом значимо не менялся. В результате индекс соотношения TNF α /IL-10 снижался в 4 раза (с 1,6 до 0,4 расч. ед.). Очевидно, под влиянием дексаметазона в популяции IFN-ДК больных РА доминируют клетки с противовоспалительной/супрессорной активностью.

Генерация IFN-ДК в присутствии дексаметазона также сопровождалась подавлением их аллостимуляторной активности, что проявлялось 2-кратным снижением пролиферативного ответа Т-клеток в алло-СКЛ в присутствии ДК_{DEX} по сравнению с интактными IFN-ДК. Характерно, что интенсивность пролиферации в алло-СКЛ коррелировала с фенотипом ДК_{DEX}, в частности находилась в прямой взаимосвязи с относительным содержанием CD83⁺ клеток (r_s = 0,75; p = 0,002) и в обратной – с количеством TLR2⁺ клеток (r_s = -0,71; p = 0,02).

Наконец, обработка IFN-ДК больных РА дексаметазоном приводила к выраженному угнетению их Th1-стимулирующей активности в алло-СКЛ. Так, уровень продукции IFN γ в СКЛ, стимулированной ДК_{DEX}, снижался в 16 раз по сравнению с культурами, индуцированными интактными ДК (с 960 до 60 пкг/мл, p_w = 0,001). Соответственно, снижался и индекс влияния ДК_{DEX} на секрецию IFN γ . В то же время обработка IFN-ДК больных РА дексаметазоном не влияла на их Th2-стимулирующую активность, поскольку характер продукции IL-6 значимо не менялся в сравнении с культурами, стимулированными интактными ДК. Индекс соотношения IL-6/IFN γ при этом увеличивался более чем в 10 раз, в среднем с 7,9 до 93 расч. ед. (p_w = 0,023). Можно заключить, что дексаметазон-модифицированные IFN-ДК больных РА сдвигают Th1→Th2 баланс в сторону Т-хелперов 2 типа, главным образом за счет угнетения активности Th1-клеток, а не вследствие активации Th2-клеток.

Влияние дексаметазона на фенотип и функции IFN-ДК здоровых доноров было исследовано нами ранее [1]. Проведенный сравнительный анализ показал, что ДК_{DEX} больных РА и доноров обладали одинаково низкой аллостимуляторной и Th1-стимулирующей активностью (данные не представлены). Однако, дексаметазон-модифицированные IFN-ДК у больных РА отличались повышенным содержанием CD14⁺ клеток (Me 81 против 57% у доноров, p_U = 0,06) и досто-

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ДЕКСАМЕТАЗОНА НА ФЕНОТИП И ФУНКЦИИ IFN-ДК БОЛЬНЫХ РА
TABLE 3. THE EFFECT OF DEXAMETHASONE ON PHENOTYPE AND FUNCTIONS OF IFN-DCs FROM RA PATIENTS

Параметр Parameter	IFN-ДК больных РА IFN-DCs of patients with RA						p _w
	Интактные (ДК _{ИНТ}) Non-treated (DC _{ИНТ})			Дексаметазон-модифицированные (ДК _{ДЕХ}) Dexamethasone-treated (DC _{ДЕХ})			
	Медиана Median	Q _{0,25} -Q _{0,75}	n	Медиана Median	Q _{0,25} -Q _{0,75}	n	
Фенотип (%) Phenotype (%)							
CD14 ⁺	65	44-81	10	81	62-92	10	0,34
CD83 ⁺	8,5	6-23	10	7,9	4-18	10	0,02
CD86 ⁺	49	39-70	10	41	28-68	10	0,07
HLA-DR ⁺	75	60-81	10	77	28-88	10	0,75
TLR2 ⁺	51	27-73	10	67	54-76	10	0,50
B7-H1 ⁺	77	56-84	10	70	61-76	10	0,13
Продукция цитокинов (пкг/мл) Cytokine production (pg/mL)							
TNF α	3780	850-4230	5	510	250-900	5	0,007
IL-6	16960	14680-22180	5	9900	8780-19000	5	0,07
IL-10	1900	1110-2700	5	2040	1890-2190	5	0,61
TNF α /IL-10	1,6	1,44-3,41	5	0,4	0,12-1,03	5	0,13
Стимуляторная активность в алло-СКЛ Stimulatory activity in allo-MLC							
Пролиферация (имп/мин) Proliferation (cpm)	7980	3700-13440	9	3940	930-6060	9	0,009
ИБ (расч. ед.) Influence index (calc. units)	25,5	4,6-47	9	9,9	3,7-28	9	0,009
Th1-/Th2-стимулирующая активность в алло-СКЛ Th1/Th2 stimulatory activity in allo-MLC testing							
IFN γ (pg/mL)	960	590-1740	12	60	30-270	12	0,001
ИБ (расч. ед.) Influence index (calc. units)	101	62-182	12	6,0	3,4-28	12	0,001
IL-6 (pg/mL)	8560	6780-9280	12	7710	6260-9610	12	0,31
ИБ (расч. ед.) Influence index (estim. units)	37	29-40	12	33	27-41	12	0,31
IL-6/IFNγ (расч. ед.) IL-6/IFN γ (estim. units)	7,9	2,5-15	12	93	28-275	12	0,023

Примечание. p_w – W-критерий Вилкоксона для связанных выборок.

Note. p, Wilcoxon-matched pairs (W-test).

верно более высокой продукцией IL-10 (Me 2040 против 1020 пкг/мл у доноров, $p_U = 0,03$). Можно предположить, что IFN-ДК больных РА более чувствительны к толерогенному эффекту глюкокортикоидов, чем ДК здоровых доноров.

Обсуждение

В настоящем исследовании впервые охарактеризованы свойства ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN α , у больных РА. Сравнительный анализ показал, что IFN-ДК больных РА отличаются от ДК здоровых доноров повышенной экспрессией CD14 и сниженной экспрессией CD83 за счет увеличения доли CD14⁺CD83⁻ и снижения доли CD14⁺CD83⁺ клеток, что свидетельствует о задержке созревания. Кроме того, IFN-ДК пациентов характеризуются повышенной экспрессией TLR2 (на уровне тенденции) и значимым возрастанием B7-H1, ассоциированных с толерогенными свойствами ДК [4, 34]. Эти фенотипические изменения не сказываются критично на способности IFN-ДК больных продуцировать про- и противовоспалительные цитокины, стимулировать пролиферацию аллогенных Т-лимфоцитов и индуцировать Т-клетки к продукции Th1- и Th2-цитокинов в алло-СКЛ. По всем вышеперечисленным параметрам ДК больных РА значимо не отличались от IFN-ДК доноров. Некоторое снижение аллостимуляторной и Th1-/Th2-стимулирующей активности IFN-ДК у больных РА было статистически недостоверным.

Данные о фенотипических и функциональных свойствах ДК моноцитарного происхождения при РА немногочисленны и касаются исключительно ДК, генерируемых в присутствии IL-4. В целом IL4-ДК больных РА схожи с ДК доноров по экспрессии CD14, CD80, CD86, CD83, HLA-DR и TLR-2 за исключением повышенной экспрессии CD32 (Fc- γ PIR) на незрелых ДК [11, 26]. Незрелые IL4-ДК больных также не отличаются от ДК доноров по продукции провоспалительных (IL-1 β , IL-6, TNF α), Th1- (IL-12, IFN γ) и Th2- (IL-10) цитокинов. В то же время для зрелых IL4-ДК больных РА характерна повышенная продукция провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF α) и IL-10, а также ряда хемокинов (CCL18, CCL19, CCL17). Причем стимуляция ДК больных через Fc- γ PIR подавляет продукцию IL-6 и TNF α , что свидетельствует о преобладающей экспрессии Fc- γ PIRb (но не Fc- γ PIRa), который обеспечивает негативный сигналинг в отношении продукции провоспалительных цитокинов [26, 27, 28]. Показано также, что более высокий уровень продукции IL-6/IL-23 ДК больных обуславливает их повышенную способность индуцировать Th17 [8]. Полученные нами результаты несколько расходятся с данно-

ми литературы о фенотипической схожести зрелых IL4-ДК у больных РА и доноров, что может быть обусловлено различиями ДК, генерированных в присутствии IFN α и IL-4 по степени зрелости и ряду функциональных свойств [15]. С другой стороны, полученные нами данные о схожей продукции цитокинов IFN-ДК больных РА и доноров согласуются с данными литературы [28] в отношении незрелых IL4-ДК.

Вторым важным моментом в настоящей работе является оценка влияния дексаметазона на IFN-ДК больных РА. Учитывая, что при аутоиммунных заболеваниях IFN α играет важную роль в дифференцировке моноцитов в ДК и поддержании активированного статуса циркулирующих ДК [3, 10], IFN-ДК могут являться мишенями глюкокортикоидной терапии, активно используемой в лечении РА. Ранее нами показано, что IFN-ДК доноров (аналогично IL4-ДК) чувствительны к толерогенному действию дексаметазона [1]. В настоящем исследовании продемонстрировано, что обработка дексаметазоном IFN-ДК больных РА также изменяет их фенотипические и функциональные свойства. В частности, дексаметазон значимо ингибирует экспрессию CD83 и в виде выраженного тренда – CD86 – достоверно подавляет продукцию ДК TNF α и в виде тенденции – IL-6 – снижает аллостимуляторную активность и способность IFN-ДК индуцировать Т-клетки к продукции Th1-цитокинов, смещая баланс в сторону Th2-стимулирующей активности.

Следует отметить, что эффект дексаметазона на уровне индивидуальных значений характеризуется выраженной разнородностью. Например, супрессорный эффект в отношении аллостимуляторной активности ДК варьирует от 8 до 93%. Не исключено, что оценка чувствительности IFN-ДК больных РА к действию дексаметазона может иметь значение в прогнозе эффективности лечения при проведении пульс-терапии глюкокортикоидами.

Наш интерес к IFN-ДК и их чувствительности к дексаметазону обусловлен также возможностью создания толерогенных ДК-вакцин. В настоящее время показано, что толерогенные ДК функционируют как негативные регуляторы аутореактивных Т-клеток [36], обладают терапевтическим потенциалом, и их применение открывает новые возможности в лечении РА [2, 22, 32, 39]. Дексаметазон, ингибируя NF- κ B зависимую дифференцировку и созревание ДК [7, 19], позволяет индуцировать толерогенные ДК со стабильным фенотипом. Кроме того, дексаметазон, будучи лекарственным препаратом, может быть использован для получения толерогенных ДК-вакцин в полном соответствии с GMP стандартами [11, 12]. Учитывая также данные о более высокой ми-

грационной активности IFN-ДК по сравнению с ИЛ4-ДК [23], модифицированные дексаметазоном IFN-ДК могут рассматриваться в качестве новой клеточной платформы для получения толерогенных ДК-вакцин. Действительно, ДК_{DEX} у больных РА, так же как и у здоровых доноров [1], характеризуются одинаково высокой экспрессией TLR2, низкой продукцией TNF α , а также низкой аллостимуляторной и Th1-стимулирующей активностью. При этом ДК_{DEX} у больных РА отличались от клеток доноров более высокой продукцией ИЛ-10 ($p_U = 0,03$).

Следует отметить, что повышенная экспрессия TLR2 является одним из характерных признаков толерогенных ДК. ДК с высокой экспрессией TLR-2 в ответ на стимуляцию LPS активно секретируют ИЛ-10, тогда как продукция TNF α и IFN γ остается на низком уровне. Кроме того, TLR-2 молекула играет важную роль в активации регуляторных Т-клеток, супрессии ИЛ-23, Th17- и Th1-опосредованного иммунного ответа [4, 17]. Действительно, согласно нашим данным, способность ДК_{DEX} больных РА стимулировать пролиферацию Т-клеток в алло-СКЛ находилась в обратной связи с содержанием TLR2⁺ клеток ($r_s = -0,71$; $p = 0,02$).

Согласно данным литературы, ИЛ4-ДК у больных РА могут иметь селективную дефектность в чувствительности к толерогенным сигналам. Так, при индукции толерогенных ДК путем активации через PSGL-1 (селектином Р), ДК больных не способны индуцировать CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺Treg, тогда как при индукции ИЛ-10 сохраняют такую способность [8]. Также показано, что, в отличие от ДК доноров, стимуляция ИЛ4-ДК больных ИЛ-13 не приводит к усилению Fc- γ IRb, проводящего ингибирующий сигнал в отношении продукции провоспалительных цитокинов ДК [26, 28]. Наше исследование имеет ряд ограничений, в частности в нем не изучалась способность ДК к индукции апоптоза/анергии Т-лимфоцитов и генерации регуляторных Т-клеток, а также не оценивалось влияние дексаметазона на способность ДК стимулировать Th17-ответ. Вместе с тем, учитывая повышенную генерацию Th17 [21] и дефицит Treg [13] при РА, анализ вышеперечисленных функций ДК у больных РА представляет безусловный интерес как с точки зрения раскрытия патогенетической значимости ДК, так и перспектив применения толерогенных ДК в лечении РА и является предметом дальнейших исследований.

Список литературы / References

1. Курочкина Ю.Д., Леплина О.Ю., Тихонова М.А., Тыринова Т.В., Баторов Е.В., Сизиков А.Э., Останин А.А., Черных Е.Р. Влияние дексаметазона на интерферон- α -индуцированную дифференцировку моноцитов в дендритные клетки // *Медицинская иммунология*, 2016, Т. 18, № 4, с. 347-356. [Kurochkina Yu.D., Leplina O.Yu., Tikhonova M.A., Tyrinova T.V., Batorov E.V., Sizikov A.E., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Effect of dexamethasone on interferon- α -induced differentiation of monocytes to dendritic cells. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 4, pp. 347-356. (In Russ.) doi: 10.15789/1563-0625-2016-4-347-356
2. Ahmed M.S., Bae Y.S. Dendritic cell-based immunotherapy for rheumatoid arthritis: from bench to bedside. *Immune Netw.*, 2016, Vol. 16, no. 1, pp. 44-51.
3. Blanco P., Palucka A.K., Gill M., Pascual V., Banchereau J. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science*, 2001, Vol. 294, no. 5546, pp. 1540-1543.
4. Chamorro S. TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 2984-2994.
5. Chen K., Wang J.M., Yuan R., Yi X., Li L., Gong W., Yang T., Li L., Su S. Tissue-resident dendritic cells and diseases involving dendritic cell malfunction. *Int. Immunopharmacol.*, 2016, Vol. 34, pp.1-15.
6. Chen E., Keystone E.C., Fish E.N. Restricted cytokine expression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 1993, Vol. 36, no. 7, pp. 901-910.
7. Coutinho A.E., Chapman K.E. The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 2011, Vol. 335, no. 1, pp. 2-13.
8. Estrada-Capetillo L., Hernandez-Castro B., Monsivais-Urenda A., Alvarez-Quiroga C., Layseca-Espinosa E., Abud-Mendoza C., Baranda L., Urzainqui A., Sanchez-Madrid F., Gonzalez-Amaro R. Induction of Th17 lymphocytes and Treg cells by monocyte-derived dendritic cells in patients with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Clin. Dev. Immunol.*, 2013, Vol. 2013, Article ID 584303, 9 p.
9. Gessani S., Conti L., Del Cornò M., Belardelli F. Type I interferons as regulators of human antigen presenting cell functions. *Toxins (Basel)*, 2014, Vol. 6, no. 6, pp. 1696-1723.
10. Gottenberg J.E., Chiochia G. Dendritic cells and interferon-mediated autoimmunity. *Biochimie*, 2007, Vol. 89, no. 6-7, pp. 856-871.
11. Harry R.A., Anderson A.E., Isaacs J.D., Hilkens C.M. Generation and characterization of therapeutic tolerogenic dendritic cells for rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, 2010, Vol. 69, no. 11, pp. 2042-2050.
12. Hilkens C.M.U., Isaacs J.D. Tolerogenic dendritic cells in clinical practice. *Open Arthritis Journal*, 2010, Vol. 3, pp. 8-12.

13. van Roon J.A.G., Hartgring S.A.Y., van der Wurff-Jacobs K.M.G., Bijlsma J.W.J., Lafeber F.P.J.G. Numbers of CD25⁺Foxp3⁺ T cells that lack the IL-7 receptor are increased intra-articularly and have impaired suppressive function in RA patients. *Rheumatology*, 2010, Vol. 49, no. 6, pp. 2084-2089.
14. Khan S., Greenberg J.D., Bhardwaj N. Dendritic cells as targets for therapy in rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2009, Vol. 5, no. 10, pp. 566-571.
15. Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Interferon alpha induces generation of semi-mature dendritic cells with high pro-inflammatory and cytotoxic potential. *Cytokine*, 2015, Vol. 71, no. 1, pp. 1-7.
16. Liu J., Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 63, pp. 1-12.
17. Manicassamy S., Ravindran R., Deng J., Oluoch H., Denning T.L., Kasturi S.P., Rosenthal K.M., Evavold B.D., Pulendran B. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 4, pp. 401-409.
18. Martin C.A., Carsons S.E., Kowalewski R., Bernstein D., Valentino M., Santiago-Schwarz F. Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 171, no. 11, pp. 5736-5742.
19. Matasic R., Dietz A.B., Vuk-Pavlovic S. Dexamethasone inhibits dendritic cell maturation by redirecting differentiation of a subset of cells. *J. Leukoc. Biol.*, 1999, Vol. 66, no. 6, pp. 909-914.
20. Miossec P., Naviliat A., Duput-d'Angeac A., Sany J., Banchereau J. Low levels of interleukin-4 and high levels of transforming growth factor beta in rheumatoid synovitis. *Arthr. Rheum.*, 1999, Vol. 33, pp. 1180-1187.
21. Aerts N.E., De Knop K.J., Leysen J., Ebo D.G., Bridts C.H., Weyler J.J., Stevens W.J., De Clerck L.S. Increased IL-17 production by peripheral T helper cells after tumour necrosis factor blockade in rheumatoid arthritis is accompanied by inhibition of migration associated chemokine receptor expression. *Rheumatology (Oxford)*, 2010, Vol. 49, no. 12, pp. 2264-2272.
22. Ning B., Wei J., Zhang A., Gong W., Fu J., Jia T., Yang S.Y. Antigen-specific tolerogenic dendritic cells ameliorate the severity of murine collagen-induced arthritis. *PLoS One*, 2015, Vol. 10. doi: 10.1371/journal.pone.0131152
23. Parlato S., Santini S.M., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada M., Giammarioli A.M., Malorni W., Fais S., Belardelli F. Expression of CCR-7, MIP-3beta, and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood*, 2001, Vol. 98, no. 10, pp. 3022-3029.
24. Pettit A.R., Thomas R. Dendritic cells: the driving force behind autoimmunity in rheumatoid arthritis? *Immunol. Cell. Biol.*, 1999, Vol. 77, no. 5, pp. 420-427.
25. Qu C., Brinck-Jensen N.S., Zang M., Chen K. Monocyte-derived dendritic cells: targets as potent antigen-presenting cells for the design of vaccines against infectious diseases. *Int. J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 19, pp. 1-5.
26. Radstake T.R., Nabbe K.C., Wenink M.H., Roelofs M.F., Oosterlaar A., van Lieshout A.W., Barrera P., van Lent P.L., van den Berg W.B. Dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis lack the interleukin 13 mediated increase of FcRII expression, which has clear functional consequences. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, Vol. 64, pp. 1737-1743.
27. Radstake T.R., van der Voort R., ten Brummelhuis M., de Waal Malefijt M., Looman M., Figdor C.G., van den Berg W.B., Barrera P., Adema G.J. Increased expression of CCL18, CCL19, and CCL17 by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and regulation by Fc gamma receptors. *Ann. Rheum. Dis.*, 2005, Vol. 64, no. 3, pp. 359-367.
28. Radstake T.R., van Lent P.L., Pesman G.J., Blom A.B., Sweep F.G., Ronnelid J., Adema G.J., Barrera P., van den Berg W.B. High production of proinflammatory and Th1 cytokines by dendritic cells from patients with rheumatoid arthritis, and down regulation upon Fc gamma triggering. *Ann. Rheum. Dis.*, 2004, Vol. 63, no. 6, pp. 696-702.
29. Rodriguez-Carrio J., de Paz B., Lypez P., Prado C., Alperi-Lopez M., Ballina-Garcia F.J., Suarez A. IFN α serum levels are associated with endothelial progenitor cells imbalance and disease features in rheumatoid arthritis patients. *PLoS One.*, 2014, Vol. 9, no. 1, doi: 10.1371/journal.pone.0086069.
30. Ronnblom L., Eloranta M.L. The interferon signature in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Rheumatol.*, 2013, Vol. 25, no. 2, pp. 248-253.
31. Santiago-Schwarz F., Anand P., Liu S., Carsons S.E. Dendritic cells (DCs) in rheumatoid arthritis (RA): progenitor cells and soluble factors contained in RA synovial fluid yield a subset of myeloid DCs that preferentially activate Th1 inflammatory-type responses. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 167, no. 3, pp. 1758-1768.
32. Schinnerling K., Soto L., Garcia-Gonzalez P., Catalan D., Aguillyn J.C. Skewing dendritic cell differentiation towards a tolerogenic state for recovery of tolerance in rheumatoid arthritis. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 6, pp. 517-527.
33. Schultz H.S., Guo L., Keller P., Fleetwood A.J., Sun M., Guo W., Ma C., Hamilton J.A., Björkdahl O., Berchtold M.W., Panina S. OSCAR-collagen signaling in monocytes plays a proinflammatory role and may contribute to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Immunol.*, 2016, Vol. 46, no. 4, pp. 952-963.
34. Selenko-Gebauer N., Majdicht J., Szekeres A., Höfler G., Guthann E., Korthäuer U., Zlabinger G., Steinberger P., Pickl W.F., Stockinger H., Knapp W., Stöckl J. B7-H1 (Programmed Death-1 Ligand) on dendritic cells is involved in the induction and maintenance of T cell anergy. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 7, pp. 3637-3644.

35. Thomas R., MacDonald K.P., Pettit A.R., Cavanagh L.L., Padmanabha J., Zehntner S. Dendritic cells and the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *J. Leukoc. Biol.*, 1999, Vol. 66, no. 2, pp. 286-292.
36. Torres-Aguilar H., Aguilar-Ruiz S.R., Gonzalez-Perez G., Munguia R., Bajaca S., Meraz-Rios M.A., Sanchez-Torres C. Tolerogenic dendritic cells generated with different immunosuppressive cytokines induce antigen-specific anergy and regulatory properties in memory CD4⁺ T cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 4, pp. 1765-1775.
37. Tsark E.C., Wang W., Teng Y.C., Arkfeld D., Dodge G.R., Kovats S. Differential MHC class II-mediated presentation of rheumatoid arthritis autoantigens by human dendritic cells and macrophages. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 11, pp. 6625-6633.
38. Wenink M.H., Han W., Toes R.E., Radstake T.R. Dendritic cells and their potential implication in pathology and treatment of rheumatoid arthritis. *Handb. Exp. Pharmacol.*, 2009, Vol. 188, pp. 81-98.
39. Zhao Y., Zhang A., Du H., Guo S., Ning B., Yang S. Tolerogenic dendritic cells and rheumatoid arthritis: current status and perspectives. *Rheumatol. Int.*, 2012, Vol. 32, no. 4, pp. 837-844.

Авторы:

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

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

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

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

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

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

Чумасова О.А. — к.м.н., врач-ревматолог отделения ревматологии клиники иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Останин А.А. — д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточной иммуноterapiи 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

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

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

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

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

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

Chumasova O.A., PhD (Medicine), Physician (Rheumatology), Immunopathology Clinics, 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

МИССЕНС-МУТАЦИЯ Gln11Leu ГЕНА TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 7 И ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К ПСОРИАЗУ

Галимова Э.С.^{1,2}, Кинго К.³, Кокс С.¹

¹ Институт биомедицины и трансляционной медицины, Тартуский университет, г. Тарту, Эстония

² ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра» РАН, г. Уфа, Россия

³ Институт клинической медицины, Тартуский университет, г. Тарту, Эстония

Резюме. Toll-подобные рецепторы (TLRs) – консервативные рецепторы, которые распознают патоген-ассоциированные микробные структуры. Эти рецепторы экспрессируются на клетках кожи, в том числе кератиноцитах, меланоцитах и клетках Лангерганса. Многочисленные экспериментальные исследования свидетельствуют о ключевой роли TLRs в патогенезе иммунопатологических заболеваний, в том числе псориаза.

Цель исследования – анализ ассоциаций полиморфных вариантов гена *TLR7* с риском развития псориаза. Использованы образцы ДНК 138 больных псориазом и 317 здоровых доноров. Генотипирование полиморфных локусов rs179003, rs179008, rs179020, rs850632, rs12013728 гена *TLR7* проведено с использованием SNPlex платформы (AB, США). В общей выборке больных псориазом обнаружена ассоциация аллеля *T* (rs179008) гена *TLR7* с повышенным риском развития заболевания ($P_c = 0,0065$, $OR = 1,95$). Кроме того, носительство аллеля *T* (rs179008) гена *TLR7* повышает риск развития псориаза у больных с поздним началом развития заболевания и спорадической формой ($P_c = 0,0004$, $OR = 2,50$ и $P_c = 0,0078$, $OR = 2,2$ соответственно). В результате проведенного молекулярно-генетического исследования идентифицировано, что миссенс-мутация Gln11Leu гена *TLR7* вносит определенный вклад в развитие предрасположенности псориазом. Для подтверждения результатов настоящего исследования необходимы репликативные исследования на независимых выборках и функциональный анализ.

Ключевые слова: псориаз, врожденный иммунитет, генетика, *TLR7*, миссенс-мутация Gln11Leu, ассоциация

TOLL-LIKE RECEPTOR 7 GENE Gln11Leu MISSENSE-MUTATION AND SUSCEPTIBILITY TO PSORIASIS

Galimova E.S.^{a, b}, Kingo K.^c, Kõks S.^a

^a Institute of Biomedicine and Translational Medicine, Faculty of Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia

^b Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

^c Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia

Abstract. Toll-like receptor (TLR) are responsible for recognizing various molecular patterns associated with pathogens. Their expression have been detected in skin cells such as keratinocytes and melanocytes. Numerous experimental studies demonstrate the key role of TLRs in the pathogenesis of immune diseases, including psoriasis.

The objective of this study is to analyze the associations of polymorphisms in *TLR7* gene and the risk of psoriasis development. DNA samples were collected from 138 patients with psoriasis and 317 healthy controls. Genotyping of rs179003, rs179008, rs179020, rs850632, rs12013728 polymorphic loci in *TLR7* gene was performed using the SNPlex™ method (AB, USA).

Адрес для переписки:

Галимова Эльвира Сафуановна
ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского
научного центра» РАН
450054, Россия, г. Уфа, пр. Октября, 71.
Тел./факс: 8 (3472) 235-60-88.
E-mail: elya-4@yandex.ru

Address for correspondence:

Galimova Elvira S.
Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center,
Russian Academy of Sciences
450054, Russian Federation, Ufa, Prospect Oktyabrya, 71.
Phone/Fax: 7 (3472) 235-60-88.
E-mail: elya-4@yandex.ru

Образец цитирования:

Э.С. Галимова, К. Кинго, С. Кокс «Миссенс-мутация Gln11Leu гена Toll-подобного рецептора 7 и предрасположенность к псориазу» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 267-274.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-267-274

© Галимова Э.С. и соавт., 2017

For citation:

E.S. Galimova, K. Kingo, S. Kõks "Toll-like receptor 7 gene Gln11Leu missense-mutation and susceptibility to psoriasis", *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 267-274.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-267-274

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-267-274

SNP in the *TLR7* gene rs179008 (Gln11Leu) was associated with psoriasis in entire psoriasis, late onset and sporadic subgroups (Pc = 0.0065, OR = 1.95; Pc = 0.0004, OR = 2.50; Pc = 0.0078, OR = 2.2, respectively). In conclusion, this study is the first to identify genetic variants of the *TLR7* gene significantly associated with psoriasis.

Keywords: psoriasis, innate immunity, genetics, *TLR7* gene, missense-mutation Gln11Leu, association

Финансирование: работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (гранты № 14-04-97026-р_Поволжье_а и 13-04-01489), Научного фонда Эстонии (гранты № 7549 и 7479), Министерства науки и образования Эстонии (грант № SF0180043s07), программы финансирования университетских научно-исследовательских проектов Министерства науки и образования Эстонии (IUT20-46) и гранта Евросоюза – Европейского фонда регионального развития.

Funding. This research was funded by the Russian Foundation for Basic Research grant 14-04-97026-r_Volga region_a, and 13-04-01489, the Estonian Science Foundation grants 7549 and 7479, the Estonian Ministry of Science and Education grant SF0180043s07, the European Union through the European Regional Development Fund, institutional research funding IUT20-46 of the Estonian Ministry of Education and Research.

Введение

Псориаз – хронический дерматоз многофакторной природы с доминирующим значением в его развитии генетических факторов [2, 3, 4]. Проведенные молекулярно-генетические исследования выявили ассоциацию и сцепление 19 геномных локусов с псориазом, при этом максимальный LOD-балл был получен для локуса *PSORS1* в хромосомном регионе 6p21.3 главного комплекса гистосовместимости (*MHCI* – major histocompatibility complex) [1, 5, 36]. Полногеномные исследования ассоциаций полиморфных вариантов (GWAS Genome-Wide Association Studies) идентифицировали более 40 хромосомных регионов по всему геному, ассоциированных с псориазом: гены сигнальных путей врожденного иммунитета, адаптивного иммунитета и барьерной функции кожи [31]. В ряде исследований показана роль полиморфных локусов (SNPs – Single nucleotide polymorphism) и мутаций генов цитокинов и цитокиновых рецепторов, а также компонентов их сигнальных путей в патогенезе заболевания [6, 7, 8, 9, 21].

В настоящее время активно изучаются функции и значение Toll-подобных рецепторов (TLRs – Toll-like receptors), играющих центральную роль в системе иммунной защиты кожи. Различные типы этих рецепторов установлены на основных клеточных популяциях – от эпителиальных до иммунокомпетентных, таких как кератиноциты, фибробласты, антиген-презентирующие клетки и меланоциты. Активация TLRs через внутриклеточные сигнальные пути приводит к образованию провоспалительных стимулов и инициирует сигнал, трансформирующий кожу в функциональное состояние защиты. Таким образом, TLRs участвуют в гомеостазе и восстановлении ткани.

TLRs – класс клеточных рецепторов с одним трансмембранным фрагментом, которые распознают консервативные структуры различных патогенов, активируя клеточный иммунный ответ [10], и тем самым играют ключевую роль во врожденном иммунитете и формировании

второй линии защиты – адаптивного иммунитета. В настоящее время известны 10 клеточных TLRs, которые связывают определенные лиганды и продуцируются в организме различными клетками. TLRs активируются при связывании лигандов, которые, главным образом, являются структурными компонентами бактерий, вирусов и грибов [11]. Патоген-кодируемые лиганды относятся к трем категориям: липиды и липопептиды (TLR1/TLR2; TLR2/TLR6; TLR4), протеины (TLR5) и нуклеиновые кислоты (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9). TLR3 распознает двухцепочечную РНК вирусов (ds RNA), TLR7 и TLR8 распознают одноцепочечную РНК (ss RNA), тогда как TLR9 – бактериальные и вирусные ДНК и синтетические олигодиксинуклеотиды, содержащие неметилированные CG повторы [11, 13, 24, 26]. Не идентифицирована лиганда для TLR10, хотя, как показано, он является функциональным рецептором [23].

После активации TLRs происходит их олигомеризация. Олигомерный рецептор способен связывать несколько внутриклеточных адаптерных белков, которые обеспечивают последующую передачу сигнала. Всего существует пять адаптерных белков – MyD88, TIRAP, TRIF, TRAM, SARM, набор которых варьирует в зависимости от типа рецептора и сигнального пути [13]. Например, TLR4 может взаимодействовать с MyD88 и TIRAP, индуцируя синтез провоспалительных цитокинов, либо с TRIF и TRAM, что приводит к синтезу интерферонов. TLR-индуцированный интерферон может быть вовлечен в развитие таких заболеваний, как псориаз и атеросклероз [17, 30, 38]. Адаптерные белки связываются со специфическими ферментами-киназами, которые значительно усиливают сигнал и приводят в конечном итоге к продукции цитокинов, хемокинов и пептидов, которые определяют воспалительный ответ клетки [11]. Таким образом, TLR сигнал, опосредованный адаптерными белками и ферментами-киназами, приводит к активации интерферон-регуляторного фактора (IRF) и семейства транскрипционных факторов NF-κB (nuclear factor – ядерный фактор каппа-В) и по-

следующей индукции TLR-регулируемых генов [33, 41]. В целом TLRs являются одними из наиболее мощных клеточных генных модуляторов.

Рецепторы локализируются, как правило, на клеточной мембране, но могут быть и внутри клетки. TLRs экспрессируются иммунными клетками, такими как моноциты, макрофаги, дендритные клетки и гранулоциты [33]. Сравнительно недавно TLRs были идентифицированы в эпителиальных клетках и кератиноцитах [15, 27, 34, 42]. В эпидермисе кератиноциты выполняют барьерную функцию организма и определяют первую линию иммунной защиты организма от патогенов [28]. Данные о роли эпидермиса как иммунного органа подтверждаются анатомическим, молекулярным и функциональным сходством эпителиальных клеток вилочковой железы и кератиноцитов эпидермиса [28]. Исследования экспрессии TLRs в кератиноцитах здоровой и псориазической кожи представлены в нескольких работах [12, 14, 16, 39]. Английские ученые установили повышенную экспрессию TLR2 в верхнем слое эпидермиса псориазической кожи и в базальном слое здоровой и непораженной кожи, также была снижена экспрессия TLR5 в базальных кератиноцитах псориазических папул [12]. Другие исследователи обнаружили повышенную экспрессию TLR1 в базальных кератиноцитах псориазической кожи [16]. Vegon и соавт. выявили, что кератиноциты экспрессируют все известные TLRs, и цитокины TNF α и IFN γ регулируют внутрицитоплазматическую и поверхностную экспрессию большинства TLRs [14]. Seung и соавт. определили, что экспрессия TLR4 была выше в образцах кожи с каплевидным псориазом по сравнению с бляшечным псориазом и здоровой кожей [39]. Поскольку TLRs являются средством в индукции врожденного иммунитета и воздействию на адаптивный иммунитет, регулирование экспрессии TLRs при таких заболеваниях, как псориаз, атопический дерматит, лепра, системная красная волчанка и др., может быть значимым в патофизиологии данных болезней [33].

Согласно литературным данным, активация TLR7 и TLR9 эндогенными РНК или ДНК может быть важным механизмом в провоцировании таких заболеваний, как системная красная волчанка и псориаз [13]. Кроме того, учеными была исследована роль ингибиторов данных TLRs на модельных мышах и возможность использования в качестве терапевтических средств при аутоиммунных заболеваниях [13]. Хотя полная картина биологической роли TLRs до конца не ясна, изучение генетических изменений некоторых компонентов сигнального пути по каждому TLRs имеет большую перспективу [10, 11, 13]. SNPs в генах регуляторных молекул начальных этапов развития воспалительной реакции в ряде случаев обуславливает нарушения, приводящие к изменениям количественных показателей защитных реакций, что сказывается на развитии и исходе

иммунопатологических, инфекционных и воспалительных процессов [10, 11, 25, 29].

Влияние полиморфных вариантов гена *TLR7* на течение и клиническую картину псориаза в разных популяциях России является недостаточно изученным, определяя актуальность настоящего исследования. **Целью нашего исследования** являлся анализ ассоциаций полиморфных локусов гена *TLR7* с риском развития псориаза у татар Волго-Уральского региона.

Материалы и методы

В работе использованы образцы ДНК 138 больных вульгарным псориазом, состоящих на учете и находящихся на стационарном лечении в Республиканском кожно-венерологическом диспансере (г. Уфа). Выборку больных составили неродственные между собой пациенты в возрасте от 8 до 81 лет. 39 пациентов имели первые проявления псориаза до 40 лет (I тип псориаза) и 98 после 40 лет (II тип псориаза). 37 пациентов в анамнезе имели родственников больных псориазом.

Клиническое обследование больных для постановки диагноза проводили на основе специально разработанной формализованной карты истории болезни, куда включали данные о возрасте, поле, национальности больного, анамнезе заболевания, особенностях течения, наследственности, провоцирующих факторах, раннее проводимом лечении, перенесенных и сопутствующих заболеваниях. В диагностике псориазического артрита использовали критерии CASPAR (Классификация критериев псориазического артрита – Classification criteria for Psoriatic ARthritis) [35], рентгенографическое исследование суставов и позвоночника, а также анализ крови для определения ревматоидного фактора в крови пациента и исключения ревматоидного артрита.

До начала лечения и в течение курса терапии всем больным проводили обследование с применением лабораторных методов исследования (общий анализ крови и мочи, биохимическое исследование крови, проведение исследования для выявления сифилиса, гепатитов В и С, ВИЧ). У каждого больного для оценки тяжести и распространенности кожных проявлений использовали индекс PASI (Psoriasis area and severity index).

Контрольная группа была сформирована из 317 здоровых неродственных людей, соответствующих выборке больных по возрасту, полу и этнической принадлежности. Забор крови производили на станциях переливания крови у здоровых доноров, отрицающих наличие псориаза и других аутоиммунных заболеваний у себя и родственников.

ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции [32]. Было прогенотипировано 5 SNPs гена, кодирующего *TLR7* у 138 больных

ТАБЛИЦА 1. ДАННЫЕ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА *TLR7*, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ИССЛЕДОВАНИИ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF STUDIED SNPs OF *TLR7* GENE

Полиморфный локус Polymorphic locus	Хр. позиция Chr. position	Хромосома Chromosome	Ген Gene	Функциональное значение Function significance
rs179003	12895822	Хр22.3	<i>TLR7</i>	Intergenic variant
rs179008	12885540	Хр22.3	<i>TLR7</i>	exon 3 Gln11Leu
rs179020	12871738	Хр22.3	<i>TLR7</i>	intron 2
rs850632	12891447	Хр22.3	<i>TLR7</i>	3' of gene
rs12013728	12898576	Хр22.3	<i>TLR7</i>	3' of gene

псориазом и 317 здоровых доноров (табл. 1). Генотипирование 5 SNPs гена *TLR7* было осуществлено с использованием SNPlex платформы согласно протоколу (SNPlex Genotyping System 48-plex Protocol, "Applied Biosystems") на кафедре физиологии Института биомедицины и трансляционной медицины Тартуского университета. SNPlex технология основана на методе лигирования синтетических олигонуклеотидных зондов (OLA). Электрофоретический анализ меченных однонитевых фрагментов ДНК провели на автоматическом секвенаторе ABI 3730xl DNA Analyzer ("Applied Biosystems").

Соответствие наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди–Вайнберга оценивали с помощью точного критерия Фишера [22] в программе FINNETI. Статистическую обработку полученных данных проводили с использованием пакета прикладных программ PLINK [37], FINNETI и MS Excel 2013 (Microsoft).

При сравнении частот аллелей и генотипов в группах больных и здоровых лиц применяли критерий χ^2 , точный критерий Фишера и кри-

терий χ^2 с поправкой Йетса для таблиц сопряженности 2×2 . Силу ассоциаций генотипических характеристик с риском развития псориаза оценивали по значениям показателя отношения шансов (odds ratio, OR). Для коррекции множественных сравнений применяли поправку Бонферрони.

Результаты и обсуждение

Проведен анализ ассоциаций 5 полиморфных вариантов (табл. 2) гена *TLR7* с риском развития псориаза у 138 татар Волго-Уральского региона. Для проверки соответствия наблюдаемого распределения частот генотипов теоретически ожидаемому равновесному распределению по закону Харди–Вайнберга использовался критерий χ^2 . Результаты анализа распределения частот аллелей полиморфных локусов гена *TLR7* у больных псориазом и здоровых доноров представлены в таблице 2, с учетом возраста манифестации в таблице 3 и семейной отягощенности в таблице 4.

Сравнение распределения частот аллелей SNPs локусов rs179003, rs179008, rs179020,

ТАБЛИЦА 2. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА *TLR7* У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ В ЦЕЛОМ

TABLE 2. ASSOCIATION ANALYSIS OF SNPs FROM *TLR7* GENE CLUSTER WITH DISEASE IN ENTIRE PSORIASIS

Полиморфный вариант, rs Polymorphic variant, rs	Частота у больных Allele frequency in cases p n = 138	Частота у здоровых доноров Allele frequency in controls p n = 317	P-value	Pbonf-value	^a OR (95%CI)
rs179003	0,257	0,253	0,899	–	–
rs179008	0,360	0,230	8,4 × 10⁻⁵	0,0065	1,95 (CI 1,39-2,73)
rs179020	0,330	0,260	0,041	0,2038	–
rs850632	0,338	0,354	0,643	–	–
rs12013728	0,419	0,449	0,448	–	–

Примечание. Здесь и далее: p – частота аллеля, P – оценка достоверности различий по распределению частот генотипов между двумя группами, OR – отношение шансов, 95%CI – доверительный интервал, жирным выделены статистически значимые различия.

Note. Here and elsewhere, p, allele frequency; P, significance value of the genotype difference between the two groups; OR, odds ratio; 95% CI, confidence interval. Statistically significant differences are shown in bold.

ТАБЛИЦА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА TLR7 У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С УЧЕТОМ МАНИФЕСТАЦИИ ЗАБОЛЕВАНИЯ

TABLE 3. ASSOCIATION ANALYSIS OF SNPs FROM TLR7 GENE CLUSTER WITH PSORIASIS IN ONSET DISEASE SUBGROUP

Полиморфный вариант, rs Polymorphic variant, rs	Частота у больных Allele frequency in cases p n = 138	Частота у здоровых доноров Allele frequency in controls p n = 138	P-value	Pbonf-value	OR (95%CI)
Тип I < 40 лет Type I < 40 years old					
rs179003	0,317	0,253	0,216	–	–
rs179008	0,220	0,230	0,982	–	–
rs179020	0,325	0,258	0,203	–	–
rs850632	0,329	0,354	0,658	–	–
rs12013728	0,348	0,449	0,117	–	–
Тип II > 40 лет Type II > 40 years old					
rs179003	0,232	0,253	0,549	–	–
rs179008	0,42	0,23	1,5 × 10⁻⁶	0,0004	2,50 (CI 1,70-3,56)
rs179020	0,326	0,258	0,070	–	–
rs850632	0,342	0,354	0,754	–	–
rs12013728	0,451	0,449	0,961	–	–

Примечание. См. примечание к таблице 2.

Note. See note to table 2.

ТАБЛИЦА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЧАСТОТ АЛЛЕЛЕЙ ПОЛИМОРФНЫХ ЛОКУСОВ ГЕНА TLR7 У БОЛЬНЫХ ПСОРИАЗОМ И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ С УЧЕТОМ СЕМЕЙНОЙ ОТЯГОЩЕННОСТИ

TABLE 4. ASSOCIATION ANALYSIS OF SNPs FROM TLR7 GENE CLUSTER WITH PSORIASIS IN FAMILY AND SPORADIC SUBGROUPS

Полиморфный вариант, rs Polymorphic variant, rs	Частота у больных Allele frequency in cases p n = 138	Частота у здоровых доноров Allele frequency in controls p n = 138	P-value	Pbonf-value	OR (95%CI)
Семейная форма Familial form					
rs179003	0,229	0,253	0,651	–	–
rs179008	0,301	0,230	0,240	–	–
rs179020	0,309	0,258	0,368	–	–
rs850632	0,319	0,354	0,560	–	–
rs12013728	0,538	0,449	0,214	–	–
Спорадическая форма Sporadic form					
rs179003	0,270	0,253	0,6439	–	–
rs179008	0,401	0,230	8,7×10⁻⁵	0,0078	2,2 (CI 1,43-3,00)
rs179020	0,330	0,258	0,051	–	–
rs850632	0,343	0,354	0,776	–	–
rs12013728	0,380	0,449	0,116	–	–

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

rs850632 и rs12013728 гена *TLR7* между группой больных псориазом и контрольной выборкой в целом, а также с учетом манифестации болезни (I тип – до 40 лет и II тип – после 40 лет) и семейной отягощенности показало статистически значимые различия ($p < 0,05$) (табл. 1, 3, 4) для полиморфных локусов rs179008 и rs179020.

В общей выборке больных псориазом обнаружена ассоциация аллеля T rs179008 и аллеля A rs179020 гена *TLR7* с повышенным риском развития псориаза ($P = 8,4 \times 10^{-5}$; OR = 1,95 и $P = 0,041$; OR = 1,21 соответственно). Также нами было установлено, что носительство аллеля T rs179008 гена *TLR7* повышает риск развития заболевания у больных с поздним началом развития псориаза ($P = 1,5 \times 10^{-6}$, OR = 2,50). Кроме того, показана ассоциация аллеля T rs179008 с псориазом в группе со спорадической формой ($P = 8,7 \times 10^{-5}$, OR = 2,2). После введения поправки Бонферрони на множественность сравнений ассоциация rs179020 гена *TLR7* с псориазом не остается статистически значимой.

Ген *TLR7* кодирует трансмембранный белок из 1049 аминокислот. Ген картирован в области хромосомы X 12.87–12.89 и содержит один экзон. *TLR7* активирует транскрипционные факторы NF- κ B и IRF, которые запускают каскады иммунной защиты и воспаления, тем самым приводя к повышению продукции цитокинов и хемокинов. Исследователями Fitzgerald и соавт. было показано, что при нанесении на поверхность кожи, пораженной псориазом, агониста *TLR7* (Imiquimod, код CAS 99011-02-6) происходило ухудшение состояния пациента и увеличение площади поражений [20]. Таким образом, активация TLRs играет при обострении псориаза важную роль.

В соответствии с предлагаемой ролью этого рецептора *TLR7* в различных иммуноопосредованных заболеваниях, полиморфные варианты *TLR7* гена были ассоциированы со многими заболеваниями, в том числе с заболеванием Грейвса [45], системной красной волчанкой [18, 40], бронхиальной астмой [35], рассеянным склерозом [19] и витилиго [44]. Какие-либо опубликованные данные по результатам ассоциаций гена *TLR7* с псориазом отсутствуют. Ассоциация полиморфного варианта rs179008 гена *TLR7* была описана группой бразильских ученых, которые

провели генотипирование европейской популяции, и при сравнении распределения частот аллелей полиморфного варианта rs179008 гена *TLR7* (OR = 1,74, $P = 0,003$) между группой больных системной красной волчанкой и контрольной выборкой были выявлены статистически значимые различия [18]. Møller-Larsen и соавт. при исследовании больных с бронхиальной астмой европейского происхождения идентифицировали ассоциацию SNP rs179008 гена *TLR7* с заболеванием (OR = 1,53, $P = 0,0004$) [35]. Была обнаружена ассоциация rs179008 гена *TLR7* (OR = 1,25, $P = 0,03$) с временем прогрессирования заболевания у больных рассеянным склерозом европейского происхождения [19]. Traks и соавт. обнаружили, что rs179008 ($P = 0,041$, OR = 1,39) маркирует повышенный риск витилиго в эстонской популяции (OR = 1,39, $P = 0,041$) [44].

Полиморфный вариант rs179008 гена *TLR7* представляет собой миссенс-мутацию, при которой происходит замена аминокислоты глицина на лейцин в структуре белка *TLR7* (Gln11Leu). Møller-Larsen и соавт. *in silico* установили, что замена Gln11 на Leu приводит к укорачиванию N-региона и удлинению H-региона *TLR7*, что может влиять на посттрансляционную модификацию белка [35]. Определенные миссенс-мутации влияют на гидрофобность белка, его водородные, электростатические и сульфидные связи. Примечательно, что функциональность таких белков может сильно варьировать от практически нейтрального эффекта генетического полиморфизма до полного нарушения функции соответствующего белкового продукта [2, 3].

Настоящим исследованием впервые установлена ассоциация полиморфного варианта rs179008 (Gln11Leu) гена *TLR7* с развитием псориаза у индивидов татарской этнической принадлежности. Таким образом, выявленный эффект генетического маркера может быть обусловлен функциональной ролью белка *TLR7* и его патогенетическим влиянием на иммунные реакции, связанные с развитием псориаза. Исследования с применением современных методов генетического анализа вносят вклад в понимание этиопатогенеза многофакторных заболеваний, позволяют разрабатывать алгоритмы ДНК-диагностики с целью их профилактики и определять новые мишени для лекарственных препаратов.

Список литературы / References

1. Ахметова В.Л., Галимова Э.С., Юнусбаев Б.Б., Хуснутдинова Э.К. Анализ генов предрасположенности к развитию псориаза в республике Башкортостан и Хакасия // Медицинская генетика, 2009. Т. 8, № 8. С. 29-35. [Akhmetova V.L., Galimova E.S., Yunusbaev B.B., Khusnutdinova E.K. The analysis of the genes responsible for susceptibility to psoriasis in Bashkortostan and Khakasia republics. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2009, Vol. 8, no. 8, pp. 29-35. (In Russ.)]
2. Баранов В.С. Проблемы системной генетики некоторых частых многофакторных заболеваний // Медицинская генетика, 2014. Т. 13, № 3 (141). С. 3-10. [Baranov V.S. Systemic Genetic of some common complex disorders. *Meditsinskaya genetika = Medical Genetics*, 2014, Vol. 13, no. 3 (141), pp. 3-10. (In Russ.)]
3. Баранов В.С. Геномика – медицине. М.: ИКЦ «Академкнига», 2005. 63 с. [Baranov V.S. Genomics to the medicine]. Moscow: Academbook, 2005. 63 p.

4. Галимова Э.С., Ахметова В.Л., Хуснутдинова Э.К. Молекулярно-генетические основы предрасположенности к псориазу // Генетика, 2008. Т. 44, № 5. С. 594-605. [Galimova E.S., Akhmetova V.L., Khusnutdinova E.K. Molecular genetic basis of predisposition to psoriasis. *Genetika = Russian Journal of Genetics*, 2008, Vol. 44, no. 5, pp. 594-605. (In Russ.)]
5. Галимова Э.С., Ахметова В.Л., Юнусбаев Б.Б., Латыпов Б.Г., Султанова З.З., Газизова Л.Р., Галина Р.З., Котюшев В.М., Кызласова М.Х., Шушеначева Е.Е., Хуснутдинова Э.К. Гаплотипический анализ локуса *PSORS1* у больных псориазом в России. [Galimova E.S., Akhmetova V.L., Latipov B.G., Sultanova Z.Z., Gazizova L.R., Galina R.Z., Kotyshev V.M., Kizlasova M.K., Shushenakova E.E., Khusnutdinova E.K. Haplotype analysis of the *PSORS1* locus in the psoriasis patients. *Meditinskaya genetika = Medical Genetics*, 2008, Vol. 7, no. 2, pp. 26-31. (In Russ.)]
6. Галимова Э.С., Хайрутдинов В.Р., Смирнова Т.С., Лихонос Л.М., Михайличенко А.Ф., Латыпов Б.Г., Султанова З.З., Хуснутдинова Э. К. Вклад гена интерферона лямбда 1 в патогенез псориаза: репликативное исследование // Медицинская генетика, 2015. Т. 14, № 9. С. 37-43. [Galimova E.S., Khairutdinov V.R., Smirnova T.S., Likhonos L.M., Mikhailichenko A.F., Latipov B.G., Sultanova Z.Z., Khusnutdinova E.K. Contribution of Interferon lambda 1 gene in pathogenesis of psoriasis: replicative investigation. *Meditinskaya genetika = Medical Genetics*, 2015, Vol. 14, no. 9, pp. 37-43. (In Russ.)]
7. Галимова Э.С., Хуснутдинова Э.К. Ген рецептора интерлейкина 28 альфа *IL28RA* и псориаз: ассоциация с тяжестью болезни и возрастом манифестации // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 6. С. 567-572. [Galimova E.S., Khusnutdinova E.K. Interleukin 28 receptor gene alpha *IL28RA* and psoriasis: association with disease severity and age at onset. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 6, pp. 567-572. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-6-567-572
8. Галимова Э.С., Хуснутдинова Э.К. Анализ ассоциаций гена *IL20* с псориазом // Цитокины и воспаление, 2015, Т. 14, № 3, С. 103-107. [Galimova E.S., Khusnutdinova E.K. Analysis of gene *IL20* association with psoriasis. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 3, pp. 103-107. (In Russ.)]
9. Галимова Э.С., Хуснутдинова Э.К. Влияние полиморфизма гена *IL10* на манифестацию и тяжесть течения псориаза // Вестник Российского государственного медицинского университета им. Н.И. Пирогова, 2015. № 4. С. 15-18. [Galimova E.S., Khusnutdinova E.K. The impact of *IL10* gene polymorphism on manifestations and severity of psoriasis. *Vestnik Rossiyskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta im. N.I. Pirogova = Bulletin of Pirogov Russian State Medical University*, 2015, Vol. 4, pp. 15-19. (In Russ.)]
10. Akira S. Toll-like receptor signaling. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 38105-38108.
11. Akira S., Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.*, 2003, Vol. 85, pp. 85-95.
12. Baker B., Ovigne J., Powles A., Corcoran S., Fry L. Normal keratinocytes express Toll-like receptors (TLRs) 1, 2 and 5: modulation of TLR expression in chronic plaque psoriasis. *Br. J. Dermatol.*, 2003, Vol. 148, pp. 670-679.
13. Barrat F., Coffman R. Development of TLR inhibitors for the treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Rev.*, 2008, Vol. 223, pp. 271-283.
14. Begon E., Michel L., Flageul B., Beadoin I., Jean-Louis F., Bachelez H., Dubertret L., Musette P. Expression, subcellular localization and cytokinic modulation of Toll-like receptors (TLRs) in normal human keratinocytes: TLR2 up-regulation in psoriatic skin. *Eur. J. Dermatol.*, 2007, Vol. 17, no. 6, pp. 497-506.
15. Cario E., Brown D., McKee M., Lynch-Devaney K., Gerken G., Podolsky D.K. Commensal-associated molecular pattern induce selective Toll-like receptor-traffic from apical membrane to cytoplasmic compartments in polarized intestinal epithelium. *Am. J. Pathol.* 2002. Vol. 160, pp. 165-173.
16. Curry J., Qin J., Bonish B., Carrick R., Bacon P., Panella J., Robinson J., Nickoloff B.J. Innate immune-related receptors in normal and psoriatic skin. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 2003, Vol. 127, pp. 178-186.
17. Denny M., Thacker S., Mehta H., Somers E.C., Dodick T., Barrat F.J., McCune WJ., Kaplan M.J. Interferon-alpha promotes abnormal vasculogenesis in lupus: a potential pathway for premature atherosclerosis. *Blood*, 2007, Vol. 110, pp. 2907-2915.
18. dos Santos B.P., Valverde J.V., Rohr P., Monticelo O.A., Brenol J.C., Xavier R.M., Chies J.A. TLR7/8/9 polymorphisms and their associations in systemic lupus erythematosus patients from southern Brazil. *Lupus*, 2012, Vol. 21, pp. 302-309.
19. Enevold C., Oturai A.B., Sørensen P.S., Ryder L.P., Koch-Henriksen N., Bendtzen K. Polymorphisms of innate pattern recognition receptors, response to interferon-beta and development of neutralizing antibodies in multiple sclerosis patients. *Mult. Scler.*, 2010, Vol. 16, pp. 942-949.
20. Fitzgerald K.A., O'Neill L.A. The role of the interleukin-1/Toll-like receptor superfamily in inflammation and host defence. *Microbes. Infect.*, 2000, Vol. 2, no. 8, pp. 933-943.
21. Galimova E., Akhmetova V., Latipov B., Kingo K., Rätsep R., Traks T., Köks S., Khusnutdinova E. Analysis of genetic variants of class II cytokine and their receptor genes in psoriasis patients of two ethnic groups from the Volga-Ural region of Russia. *J. Dermatol. Sci.*, 2012. Vol. 68, no. 1, pp. 9-18.
22. Guo S.W., Thompson E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics*, 1992, Vol. 48, pp. 361-372.
23. Hasan U., Chaffois C., Gaillard C., Saulnier V., Merck E., Tancredi S., Guiet C., Briere F., Vlach J., Lebecque S., Trinchieri G., Bates E.E. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cell and plasmacytoid dendritic cell, which activates gene transcription through MyD88. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, pp. 2942-2950.
24. Janeway C., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu. Rev. Immunol.*, 2002, Vol. 20, pp. 197-216.
25. Janssens S., Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2003, Vol. 14, pp. 637-646.
26. Kanzler H., Barrat F., Hessel E., Coffman R. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonist and antagonist. *Nat. Med.*, 2007, Vol. 13, pp. 552-559.

27. Kawai K., Shimura H., Minagawa M.E., Ito E.A., Tomiyama K., Ito M. Expression of functional Toll-like receptor 2 on human epidermal keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.*, 2002, Vol. 30, pp. 185-194.
28. Kollisch G., Kalali B., Voelcker V., Wallich R., Behrendt H., Ring J., Bauer S., Jakob T., Mempel M., Ollert M. Various members of the Toll-like receptor family contribute to the innate immune response of human epidermal keratinocytes. *Immunology*, 2005, Vol. 114, pp. 531-541.
29. Kumagai Y., Takeuchi O., Akira S. Pathogen recognition by innate receptors. *J. Infect. Chemother.*, 2008, Vol. 14, pp. 86-92.
30. Lande R., Gregorio J., Facchinetti V., Chatterjee B., Wang Y.H., Homey B., Cao W., Wang Y.H., Su B., Nestle F.O., Zal T., Mellman I., Schroder J.M., Liu Y.J., Gilliet M. Plasmacytoid dendritic cell sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 2007, Vol. 449, pp. 564-569.
31. Mahil S.K., Capon F., Barker J.N. Genetics of psoriasis. *Dermatologic clinics*, 2015, Vol. 33, no. 1, pp. 1-11.
32. Mathew C.C. The isolation of high molecular weight eucariotic DNA. *Methods in Molecular Biology. Human Press*, 1984, no. 2, pp. 31-34.
33. McIntuff J., Modlin R., Kim J. The role of Toll-like receptors in the pathogenesis and treatment of dermatological disease. *J. Invest. Dermatol.*, 2005, Vol. 125, pp. 1-8.
34. Mempel M., Voelcker V., Kollisch G., Plank C., Rad R., Gerhard M., Schnopp C., Fraunberger P., Walli A.K., Ring J., Abeck D., Ollert M. Toll-like receptor expression in human keratinocytes: Nuclear factor κ B-controlled gene activation by *Staphylococcus aureus* is TLR2- but not TLR4- or platelet activating factor receptor (PAFR) -depend. *J. Invest. Dermatol.*, 2003, Vol. 121, pp. 1389-1396.
35. Møller-Larsen S., Nyegaard M., Haagerup A., Vestbo J., Kruse T.A., Borglum A.D. Association analysis identifies TLR7 and TLR8 as novel risk genes in asthma and related disorders. *Thorax*, 2008, Vol. 63, pp. 1064-1069.
36. Oka A., Mabuchi T., Ozawa A., Inoko H. Current understanding of human genetics and genetic analysis of psoriasis. *J. Dermatol.*, 2012, Vol. 39, pp. 231-241.
37. Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I., Daly M.J., Sham P.C. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.*, 2007, Vol. 81, no. 3, pp. 559-575.
38. Rifkin I., Leadbetter E., Busconi L., Viglianti G., Marshak-Rothstein A. Toll-like receptors endogenous ligands, and systemic autoimmune disease. *Immunol. Rev.*, 2005, Vol. 204, pp. 27-42.
39. Seung N., Park E., Kim C. Comparison of expression of heat-shock protein 60, Toll-like receptors 2 and 4, and T-cell receptor $\gamma\delta$ in plaque and guttate psoriasis. *J. Cutan. Pathology*, 2007, Vol. 34, pp. 903-911.
40. Shen N., Fu Q., Deng Y., Qian X., Zhao J., Kaufman K. M., Wud Y. L., Yud C. Y., Tanga Y., Chene J., Yangf W., Wongb M., Kawasakig A., Tsuchiyag N., Sumidag T., Kawaguchih Y., Howei H.S., Mokj M.Y., Bangk S., Liul F., Changm D., Takasakin Y., Hashimoton H., Harleyc J.B., Guthridgeo J.M., Grossmanb J.M., Cantorp R.M., Songq Y.W., Baek S., Chena S., Hahn B.H., Lauf Y.L., Tsaob B.P. Sex-specific association of X-linked Toll-like receptor 7 (TLR7) with male systemic lupus erythematosus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2010, Vol. 107, pp. 15838-15843.
41. Siren J., Pirhonen J., Julkunen I., Matikainen S. IFN- α regulates TLR-dependent gene expression of IFN- α , IFN- β , IL-28, and IL-29. *The J. Immunology*, 2005, Vol. 174, pp. 1932-1937.
42. Song P., Park Y., Abraham T., Harten B., Zivony A., Neparidze N., Armstrong C.A., Ansel J.C. Human keratinocytes express functional CD14 and toll-like receptor 4. *J. Invest. Dermatol.*, 2002, Vol. 119, pp. 424-432.
43. Taylor W., Taylor W., Gladman D., Helliwell P., Marchesoni A., Mease P., Mielants H; CASPAR Study Group. Classification criteria for psoriatic arthritis: development of new criteria from a large international study. *Arthritis and Rheumatism*, 2006, Vol. 54, no. 8, pp. 2665-2673.
44. Traks T., Keermann M., Karelson M., Rätsep R., Reimann E., Silm H., Vasar E., Kõks S., Kingo K. Polymorphisms in Toll-like receptor genes are associated with vitiligo. *Front Genet.*, 2015, Vol. 9, no. 6, p. 278.
45. Xiao W., Liu Z., Lin J., Li J., Wu K., Ma Y., Xiong C., Gong Y., Liu Z. Association of Toll-like receptor 7 and 8 gene polymorphisms with Graves' disease in Chinese Cantonese population. *Tissue Antigens*, 2015, Vol. 85, pp. 29-34.

Авторы:

Галимова Э.С. – к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики человека ФГБУН «Институт биохимии и генетики Уфимского научного центра» РАН, г. Уфа, Россия

Кюлли Кинго – профессор, заведующий кафедрой дерматологии и венерологии Института клинической медицины, факультет медицины Тартуского университета, Тарту, Эстония

Сулев Кокс – д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патофизиологии Института биомедицины и трансляционной медицины, факультет медицины Тартуского университета, г. Тарту, Эстония

Authors:

Galimova E.S., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Human Molecular Genetics, Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Research Center, Russian Academy of Sciences, Ufa, Russian Federation

Küllli Kingo, Professor, Head, Department of Dermatology and Venerology, Institute of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia

Sulev Kõks, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pathophysiology, Institute of Biomedicine and Translation Medicine, Faculty of Medicine, University of Tartu, Tartu, Estonia

Поступила 03.12.2016

Отправлена на доработку 13.12.2016

Принята к печати 26.01.2017

Received 03.12.2016

Revision received 13.12.2016

Accepted 26.01.2017

МНОГОФАКТОРНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ИММУННОГО СТАТУСА В ВЫЯВЛЕНИИ ВТОРИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ И АЛЛЕРГИИ

Кузьмина Е.Г., Зацаренко С.В.

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

Резюме. Выполнено исследование состояния иммунитета практически здоровых людей, пациентов со вторичными иммунодефицитными состояниями и аллергическими заболеваниями. Для редукции большого числа характеристик иммунитета (23 показателя) к меньшему ряду обобщающих факторов использован многофакторный анализ (метод главных компонент). Этот метод последовательно выявляет главные компоненты – независимые функциональные комплексы взаимодействующих факторов, с характеристикой силы их взаимосвязи. Главные компоненты отражают связи между отдельными показателями и располагаются по величине их вклада в общий объем информации. Метод применен для структурирования иммунологических показателей и возможности выявления особенностей (различий) состояния иммунитета больных со вторичными иммунодефицитными состояниями и аллергическими заболеваниями.

В применении к состоянию иммунитета метод главных компонент создает более отчетливый образ функционального состояния иммунной системы, выделяя основные типы реагирующих иммунокомпетентных клеток, их комбинации и взаимодействия. В общем статусе иммунитета здоровых людей (доноров крови) наибольшая роль принадлежит Т-клеточному компартменту (первая и вторая главные компоненты). Следующие по значимости компоненты отражают состояние гуморального иммунитета. Далее следуют показатели, характеризующие реакции врожденного иммунитета (натуральные, естественные, киллерные клетки, система фагоцитирующих клеток). Математическое моделирование выявляет иерархию реакций врожденного и приобретенного иммунитета, которая согласуется с уже установленными закономерностями функционирования иммунитета.

Выявлены различия величин индивидуальных показателей главных компонент доноров крови (норма), пациентов со вторичными иммунодефицитными состояниями и аллергическими заболеваниями, построенных по первой, второй и четвертой главным компонентам. Они группируют и отображают состояние 40% общего объема (дисперсии) иммунологической информации, взятой в анализ, в наибольшей степени отражая количество и функциональное состояние субпопуляций Т-клеток и в меньшей степени уровень В-клеток. При вторичных иммунодефицитах большая часть распределения индивидуальных значений главных компонент расположена в зоне отрицательных величин, а при аллергических заболеваниях – в зоне положительных значений, показатели нормы занимают промежуточное положение. Аналогично распределение главной компоненты, отражающей состояние иммунорегуляторного индекса. Величина главной компоненты, отражающей состояние

Адрес для переписки:

*Кузьмина Евгения Геннадьевна
Медицинский радиологический научный центр
им. А.Ф. Цыба – филиал ФГБУ «Национальный
медицинский исследовательский радиологический центр»
Министерства здравоохранения РФ
249036, Россия, Калужская обл., г. Обнинск,
ул. Королева, 4.
Тел.: 8 (48439) 9-32-00.
E-mail: kuzmina_e_g@mail.ru*

Address for correspondence:

*Kuzmina Evgenia G.
A. Tsyb Medical Radiological Research Centre – Branch of
the National Research Radiological Centre, Obninsk, Russian
Federation
249036, Russian Federation, Kaluga Region,
Obninsk, Korolev str., 4.
Phone: 7 (48439) 9-32-00.
E-mail: kuzmina_e_g@mail.ru*

Образец цитирования:

*Е.Г. Кузьмина, С.В. Зацаренко «Многофакторное моделирование иммунного статуса в выявлении вторичных иммунодефицитных состояний и аллергии» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 275–284.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-275-284*

© Кузьмина Е.Г., Зацаренко С.В., 2017

For citation:

*E.G. Kuzmina, S.V. Zatsarenko “Multivariate modelling of the immune status in detection of secondary immunodeficiency and the allergy”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 275–284.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-275-284*

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-275-284

активации Т-клеток, превышала норму, как при вторичных иммунодефицитах, так и при аллергиях. Многофакторный математический анализ состояния иммунитета демонстрирует эффективность в дифференциальной диагностике вторичных иммунодефицитных состояний и аллергии.

Ключевые слова: иммунитет, вторичные иммунодефицитные состояния, аллергические заболевания, многофакторный анализ, метод главных компонент

MULTIVARIATE MODELLING OF THE IMMUNE STATUS IN DETECTION OF SECONDARY IMMUNODEFICIENCY AND THE ALLERGY

Kuzmina E.G., Zatsarenko S.V.

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

Abstract. Immune status of healthy people, patients with secondary immunodeficiency and allergic diseases is assessed. To reduce the number of characteristics of immunity (23 indicators) to a number of the generalizing factors the multivariate analysis is used (principal component method). This method consistently reveals the principal components – independent functional complexes of interacting factors, with the characteristic of force of their interrelation. The principal components reflect communications between separate indicators and are located in size of their contribution to the total amount of information. The method is applied to structuring immunological indicators and a possibility of detection of features (distinctions) of the immune status of patients with secondary immunodeficiency and allergic diseases.

The method of principal components when it is applied to the assessment of immune status creates well-defined pattern of a functional condition of the immune system, accentuating main types of the reacting immunocompetent cells, their combinations and interaction. In the general immune status of healthy people (blood donors) the T cell compartment (the first and second the principal components) plays the major role. The second in importance components reflect the humoral immunity status. The indicators describing the response of the innate immunity (natural killer cells, the system phagocytic cells), follow them. Mathematical modeling reveals hierarchy of responses of innate and adaptive immunity, which is in agreement with established mechanisms of immune response.

Differences of individual indicators of principal components of donors blood (norm), the patients with secondary immunodeficiency and allergic diseases built in the first, second and fourth to the principal components are detected. They group and display the status of 40% of the total amount (dispersion) of immunological information taken in the analysis accentuating quantity and a functionality of T cells subpopulations and to a lesser extent – the level of B cells. In case of secondary immunodeficiency the major part of distribution of values principal individual components is in a zone of negative values, and in case of allergic diseases – in a zone of positive values, indicators of the norm are in the intermediate position. Distribution of the principal component, reflecting immunoregulatory index is similar. The principal component value describing the activation of T cells, exceeded the norm, in case of secondary immunodeficiency, and in case of allergies. Multivariate mathematical analysis of immune status demonstrates its usefulness for differential diagnosis of secondary immunodeficiency and an allergic diseases.

Keywords: immunity, secondary immunodeficiency, allergic disease, multivariate analysis, principal component method

Введение

Иммунная система представляет собой комплекс взаимодействующих клеточных компонентов, работа которых осуществляется по принципу сетевой организации с участием большого числа разных типов клеток и продуцируемых ими цитокинов. Поэтому для получения четкого представления о работе иммунной системы необходимо использовать большое число показателей [9].

Применение большого числа показателей (переменных) увеличивает глубину и полноту исследования и в то же время затушевывает имеющиеся

закономерности. Поэтому для правильной интерпретации иммунного статуса необходимо: предварительное выделение информативных показателей, выявление значимых взаимосвязей между ними и их количественной оценки. Для выявления скрытых взаимосвязей между показателями необходимо использовать специальные методы многофакторного анализа. К их числу относится метод главных компонент (МГК), отражающий связи между отдельными признаками, формирующими представление о целостной работе системы. Многомерные методы позволяют одновре-

менно изучать изменение набора характеристик, выявляя комплексные взаимосвязи различных сопоставляемых показателей, структуру и характер взаимосвязей между ними, т. е. проводить классификацию переменных. Конечной целью большинства многомерных статистических методов является предсказание (прогнозирование) тех или иных свойств изучаемых объектов. Интегрирующие показатели – главные компоненты (ГК), учитывающие не только величину иммунологических параметров, но и их внутрикомплексные взаимосвязи, могут оказаться более информативными при оценке состояния иммунной системы в норме и при развитии заболеваний [4, 8].

Целью настоящей работы является создание образа функционального состояния иммунной системы методом многофакторного анализа, выделяющего основные комбинации взаимодействующих иммунокомпетентных клеток, с учетом вклада в иммунитет в норме и патологии.

Решаемые задачи:

1) объединить иммунологические показатели в комплексы и выделить те из них, которые наиболее полно характеризуют процессы, происходящие в иммунной системе без существенной потери информации из множества исходных показателей, используя МГК;

2) ранжировать комплексы по величине вклада в состояние иммунной системы и отразить существующие между ними связи;

3) проверить возможность применения метода для дифференциальной диагностики иммунопатологических синдромов: вторичного иммунодефицита и аллергии.

Материалы и методы

Иммунный статус

Изучен иммунный статус трех групп пациентов: 38 пациентов со вторичными иммунодефицитными состояниями, обследованных после лучевой терапии по радикальной программе лимфомы Ходжкина в СОД 40 Гр; 51 пациент с установленными аллергическими заболеваниями и 100 практически здоровых людей (без определяемых клинико-лабораторных отклонений от нормы). Обследуемые группы пациентов сравнимы по полу и возрасту.

Иммунитет оценен по 23 показателям, характеризующим количество и функциональное состояние основных популяций иммунокомпетентных клеток: Лц (абсолютное количество лейкоцитов $\times 10^9$ кл/л), Лф (абс. кол-во лимфоцитов $\times 10^9$ кл/л и процентное содержание – %), CD3 (% и абс. кол-во $\times 10^9$ кл/л), CD4 (% и абс. кол-во Т-хелперов/индукторов $\times 10^9$ кл/л), CD8 (% и абс. кол-во Т-цитотоксических лимфоци-

тов $\times 10^9$ кл/л), соотношение CD4/CD8, CD19 (% и абс. кол-во В-лимфоцитов $\times 10^9$ кл/л), CD16 (% и абс. кол-во естественных киллеров, НК-лимфоцитов $\times 10^9$ кл/л), CD3HLA-DR (% и абс. кол-во активированных Т-лимфоцитов $\times 10^9$ клеток/л), иммуноглобулины G, M, A классов сыворотки крови (г/л), ЦИК (циркулирующие иммунные комплексы, спектрофотометрия, ед. опт. плотности), ЦИ (цитотоксичность естественных киллерных лимфоцитов по отношению к культуре клеток MOLT-4, при соотношении эффектор: мишень 25:1, %), ФЧ (фагоцитарное число, количество клеток, поглотивших микробы *St. aureus* на 100 просчитанных фагоцитов), ФИ (фагоцитарный индекс, среднее число поглощенных микробов одним фагоцитом). Для проточной цитофлюориметрии использовали моноклональные антитела (серии Leu, Москва; фирмы Becton Dickinson, США) в реакции непрямой иммунофлюоресценции с помощью двойной метки тестируемых клеток (флюоризотиоцианат FITC и фикоэритрин PE) методом проточной цитофлюориметрии (FACScan).

Метод главных компонент

МГК последовательно выявляет скрытые взаимосвязи между анализируемыми признаками, учитывая прямые и обратные корреляционные связи между ними, формирует главные компоненты, выстраивая их в определенной последовательности.

При этом предполагается, что дисперсия каждого показателя равна 1, а общая дисперсия равна общему числу показателей (для нашего примера – 23 или 100%). Это означает, что наибольшая изменчивость, которая потенциально может быть выделена, равна 23. Максимально возможное число выделяемых факторов равно числу показателей. Каждому фактору соответствует своя дисперсия (собственное значение) [7].

Чтобы проверить возможность использования модели для дифференцировки различных состояний иммунитета, МГК был применен для групп пациентов с заведомо известными заболеваниями (аллергиями и вторичными иммунодефицитными состояниями, сформировавшимися после лучевой терапии).

МГК в анализе состояния иммунитета здоровых людей

Одним из требований корректного применения МГК является нормальное распределение показателей. Сопоставление значений средних и медиан, которые близки или практически совпадают, позволяют применять этот метод [7].

Используя МГК и пакет прикладных программ STATISTICA 8.0, получены собственные значения ГК и их дисперсии (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. СОБСТВЕННЫЕ ЗНАЧЕНИЯ И ДОЛИ ДИСПЕРСИИ ДЛЯ ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ (ГК)

TABLE 1. EIGENVALUES AND DISPERSION FRACTIONS FOR THE MAIN COMPONENTS (MC)

ГК MC	Собственные значения Eigenvalues	Доля дисперсии Dispersion fraction	Дисперсия, % Dispersion, %
1	4,20	0,18	18,00
2	2,97	0,13	13,05
3	2,20	0,10	10,02
4	2,05	0,09	8,95
5	1,93	0,07	7,15
6	1,72	0,09	8,76
7	1,54	0,07	7,03
8	1,72	0,07	7,00
Σ 1-8	18,33	0,80	80
Σ 9-23	4,67	0,20	20
Σ 1-23	23	1	100,00

В таблице 1 приведены собственные значения и доли дисперсий, соответствующие каждой ГК, а также их накопленные (кумулятивные) значения. Собственные значения первых восьми компонент варьируют от 1,54 до 4,20. Начиная с 9 ГК, их собственные значения становятся меньше 1. По критерию Кайзера такие ГК должны быть исключены из анализа [7]. Кумулятивное собственное значение восьми компонент составляет 17,34 (т. е. 17 из 23 иммунологических показателей проявили высокую значимость в характеристике процессов, протекающих в иммунной системе). Их суммарная накопленная дисперсия составляет 80%, что считается достаточным для получения достоверной информации о функционировании системы [2].

Результаты и обсуждение

Формирование основных иммунологических комплексов и взаимосвязи между ними у здоровых людей

В таблице 2 приведены восемь независимых ГК, сформированных из 23 показателей иммунитета с учетом их вклада (величина собственного значения). Каждый из них учитывает наибольшую долю взаимодействующих иммунологических показателей, извлекаемых из общего массива данных по сравнению с последующим. Независимость протекания процессов, отражающих различные стороны функционирования иммунной системы, проявляется в дифференцированном выделении комбинаций показателей иммунитета (табл. 2).

ТАБЛИЦА 2. ВКЛАДЫ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ИММУНИТЕТА В ВЕЛИЧИНУ ГЛАВНЫХ КОМПОНЕНТ

TABLE 2. CONTRIBUTIONS OF IMMUNITY INDEXES TO THE VALUES OF MAIN COMPONENTS

	ГК 1 MC 1	ГК 2 MC 2	ГК 3 MC 3	ГК 4 MC 4	ГК 5 MC 5	ГК 6 MC 6	ГК 7 MC 7	ГК 8 MC 8
Лц абс., × 10 ⁹ кл/л Lymph. Abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,33	-0,01	0,04	0,17	-0,03	0,03	0,89	-0,04
Лф абс., × 10 ⁹ кл/л Lymph. Abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,96	-0,04	-0,05	0,12	-0,10	0,05	0,06	-0,14
Лф, % Lymph, %	0,63	0,00	-0,07	-0,01	-0,09	0,03	-0,72	-0,11
CD3, %	0,22	0,05	0,71	-0,16	0,33	-0,09	-0,01	0,02
CD3 абс., × 10 ⁹ кл/л CD3 abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,97	-0,01	0,15	0,04	0,04	0,02	0,04	0,07
CD4, %	0,13	-0,81	0,04	-0,23	0,08	-0,20	0,00	0,04

Таблица 2 (окончание)

	ГК 1 МС 1	ГК 2 МС 2	ГК 3 МС 3	ГК 4 МС 4	ГК 5 МС 5	ГК 6 МС 6	ГК 7 МС 7	ГК 8 МС 8
CD4 абс. , × 10 ⁹ кл/л CD4 abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,87	-0,44	-0,02	-0,02	-0,05	-0,07	0,04	0,08
CD8, %	-0,06	0,86	-0,08	-0,02	0,17	-0,15	-0,01	0,24
CD8 абс. , × 10 ⁹ кл/л CD8 abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,73	0,62	-0,11	0,06	0,06	-0,09	0,04	0,10
CD4/8	0,09	-0,97	0,08	-0,09	-0,10	0,01	0,01	0,02
CD19, %	-0,21	-0,09	0,05	-0,03	-0,93	-0,05	-0,04	0,07
CD19 абс. , × 10 ⁹ кл/л CD18 abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,42	-0,13	0,00	0,07	-0,88	-0,02	0,00	-0,04
CD16*56, %	-0,23	0,11	-0,91	-0,10	0,08	-0,06	-0,07	0,07
CD16*56 абс. , × 10 ⁹ кл/л CD16*56 abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,25	0,09	-0,93	-0,04	0,01	-0,05	-0,03	0,02
CD3 HLA-DR, %	-0,12	0,12	0,08	0,94	0,01	-0,01	0,07	0,06
CD3 HLA-DR абс. , × 10 ⁹ кл/л CD3 HLA-DR abs.,* 10 ⁹ cells/L	0,32	0,07	0,02	0,91	-0,05	0,03	0,10	0,01
IgG, g/L	-0,01	-0,20	0,05	0,04	0,05	0,65	0,06	0,04
IgA, g/L	-0,04	-0,02	-0,11	0,23	0,07	0,69	0,00	0,30
IgM, g/L	0,03	0,06	0,16	-0,19	-0,03	0,61	-0,06	-0,31
ЦИК, ед. опт. плотн. Circ. immune complexes, OD	-0,05	0,17	0,21	-0,25	0,00	0,52	0,06	0,09
ЦИ 25:1 CI	0,13	0,03	-0,15	0,01	-0,25	-0,20	-0,42	0,04
ФАГ ЧИСЛО Phag. number	0,05	-0,06	0,14	-0,01	0,10	0,03	0,05	0,65
ФАГ ИНД Phag. index	-0,06	0,05	-0,11	0,16	-0,16	0,14	0,02	0,78
Собственное зна- чение Eigenvalue	4,20	3,07	2,40	2,05	1,93	1,72	1,54	1,36
Доля общей дис- персии Fraction of total dispersion	0,18	0,13	0,10	0,09	0,07	0,09	0,07	0,07

Примечание. Жирным шрифтом выделены собственные значения, доли общей дисперсии, а также весовые нагрузки показателей высокой и средней значимости.

Note. Eigenvalues, total dispersion fractions, as well as weight loads for indexes of medium and high significance are shown in bold font.

Для выделения основных взаимодействий в каждом комплексе необходимо учитывать величину коэффициентов корреляции, r (от -1 до 0 и от 0 до 1). В соответствии с рекомендациями Крамбейна и Грейбилла, связи считаются сильными, если коэффициенты корреляции превышают 0,7; умеренными – при значении от 0,4 до 0,7. Значения меньше 0,3-0,4 говорят о слабых связях или их отсутствии [2].

Структуру каждого фактора составляют все 23 показателя иммунитета с разным уровнем вклада (весовой нагрузки), варьирующего от 0,01 до 0,97 и определяющего меру связи между ними. Показатели иммунитета с наибольшими весовыми значениями формируют внутри каждой ГК определенные комплексы взаимосвязанных иммунологических показателей. Комплексы сформировались таким образом, что в четырех из них отражена значимость количества разных типов иммунокомпетентных клеток, а в остальных – их функциональное состояние. Относительно равномерный вклад комплексов в общее состояние иммунитета (18, 13, 10, 9, 8, 7, 7 и 6%), свидетельствует о многофакторности иммунного ответа. Использование МГК для анализа клинических и иммунологических параметров в работах [5, 8] выявляет аналогичное выделение значимых показателей для ГК, сформированных по функционально-клиническим признакам, что показывает адекватность применяемого метода.

Высокий вклад абсолютного числа разных типов лимфоцитов с приоритетом роли Т-клеток: Лф ($r = 0,96$), CD3 Т-клеток ($r = 0,97$), CD4 Т-хелперов ($r = 0,87$), CD8 Т-цитотоксических лимфоцитов ($r = 0,73$), CD19 В-клеток ($r = 0,42$), меньший вклад числа НК-клеток ($r = 0,25$) и активированных CD3 HLA-DR Т-клеток ($r = 0,32$) отражены в первом комплексе.

Характер преобладающего типа иммунного ответа (гуморальный, клеточный) составляет основу второго комплекса. Относительное и абсолютное количество CD4⁺Т-клеток ($r = -0,81$; $r = -0,44$) прямо коррелирует с соотношением CD4/CD8 ($r = -0,97$), а относительное и абсолютное количество CD8⁺Т-лимфоцитов ($r = 0,86$; $r = 0,62$) проявляет обратную зависимость.

Относительное и абсолютное число НК-клеток ($r = -0,91$; $r = -0,93$) связано обратной зависимостью с относительным числом Т-клеток ($r = 0,71$). Им принадлежит наибольшая роль в третьем комплексе.

Уровень активации Т-клеток – CD3HLA-DR ($r = 0,94$; $r = 0,91$ для относительного и абсолютного числа соответственно) наиболее значим в четвертом комплексе.

Роль относительного и абсолютного количества циркулирующих В-клеток ($r = -0,93$; $r = -0,88$) выявляется пятым комплексом.

Функциональное состояние гуморального иммунитета, характеризуемое концентрацией в сыворотке крови иммуноглобулинов G, A, M классов ($r = 0,65$; $r = 0,69$; $r = 0,61$ соответственно), определяется шестым комплексом. Оно связано прямой зависимостью с уровнем ЦИК ($r = 0,52$).

Функциональное состояние НК-клеток ($r = -0,47$) прямо связано с относительным числом лимфоцитов ($r = -0,72$) и обратно – с количеством лейкоцитов ($r = 0,89$), что отражено в седьмом комплексе.

Значение функционального состояния фагоцитов (число клеток, поглотивших микробы, ФЧ, и число поглощенных микробов на один фагоцит, ФИ, $r = 0,97$; $r = 0,78$ соответственно) выявляется восьмым комплексом.

Таким образом, взаимосвязи между отдельными показателями иммунитета могут быть структурированы и выявлены при использовании факторного анализа. Факторное моделирование количества разных типов иммунокомпетентных клеток, их функционального состояния и взаимосвязей отражает их иерархию в общей картине иммунного ответа.

Метод главных компонент подразделяет состояние иммунитета по основным типам реагирования, характеризующим работу различных звеньев иммунной системы. В общем статусе иммунитета здоровых людей наибольшая роль принадлежит Т-клеточному компартменту, что отражается в первой, второй и четвертой ГК. На их долю приходится более 40% общей характеристики динамического состояния иммунитета, что составляет половину величины (80%), взятой нами как достаточный критерий характеристики иммунной системы в целом, что не противоречит установленным закономерностям функционирования Т-клеточного иммунитета. Пятая и шестая ГК отражают состояние гуморального иммунитета. Реакции неспецифического иммунитета отражены в третьей, седьмой и восьмой ГК (натуральные киллерные клетки, система фагоцитирующих клеток). Таким образом, МГК способствует выявлению иерархии взаимоотношения реакций врожденного и приобретенного иммунитета.

Дифференцированная оценка состояния иммунитета здоровых людей, пациентов со вторичными иммунодефицитными состояниями и аллергической патологией

Предпринята попытка использования МГК для дифференцирования состояния иммунитета этих категорий пациентов. У включенных в исследование пациентов (189 чел.) были рас-

ТАБЛИЦА 3. ОЦЕНКА РАЗЛИЧИЙ ГК ГРУПП КОНТРОЛЯ, ВИДС И АЛЛЕРГИИ ПО КРИТЕРИЮ СТЬЮДЕНТА (t)
TABLE 3. EVALUATION OF DIFFERENCES MAIN COMPONENTS OF CONTROL GROUPS, SIDS AND ALLERGY BY THE STUDENT CRITERION (t)

ГК MC	Контроль Control M/σ*	Аллергия Allergy M/σ	ВИДС SIDS M/σ	Контроль– аллергия Control– allergy t	Контроль– ВИДС Control SIDS t	Аллергия– ВИДС Allergy SIDS t
ГК 1 (Лф, CD3, CD4, CD8, абс.) MC1 (Lymphocytes, CD3, CD4, CD8, absolute)	0,16/2,52	4,98/6,58	-7,10/3,85	4,99	10,66	10,73
ГК 2 MC 2 (CD4/CD8, CD4, CD8, %)	0,42/1,84	2,03/3,15	-3,79/4,28	3,37	5,76	6,99
ГК 4 MC 4 (CD3 HLA-DR, absolute, %)	-1,04/1,09	1,10/2,03	1,25/1,52	6,95	8,4	0,39

Примечание. *M – среднее значение, σ – стандартное отклонение.

Note. *M, mean value; σ, standard deviation

считаны индивидуальные величины восьми ГК. Общую группу подразделили на подгруппы: пациенты с вторичными иммунодефицитными состояниями (51 чел.), аллергической патологией (38 чел.) и практически здоровые люди (100 чел.).

Выполнена оценка различий средних значений по t-критерию Стьюдента. В случае использования критерия Стьюдента для множественных сравнений, т. е. сравнения более двух групп, была введена поправка Бонферрони [1]. Для трехкратного сравнения уровень значимости должен быть $0,05/3 = 0,017$, т. е. $p < 0,01$, $T_{\text{критическое}} = 2,63$. Значимые различия между группами найдены

по величинам первой, второй и четвертой ГК, которые, как описано выше, наиболее полно отражают работу субпопуляций Т-клеток и их функциональное состояние (активацию) и в меньшей степени – роль общего числа В-клеток (табл. 3).

Для сопоставляемых групп пациентов построены гистограммы распределения индивидуальных значений ГК, диапазон которых колебался от -13 до 14. Распределение средних значений индивидуальных показателей 1ГК, характеризующих относительное и абсолютное число субпопуляций Т-лимфоцитов и В-клеток, различалось в сравниваемых группах (рис. 1).

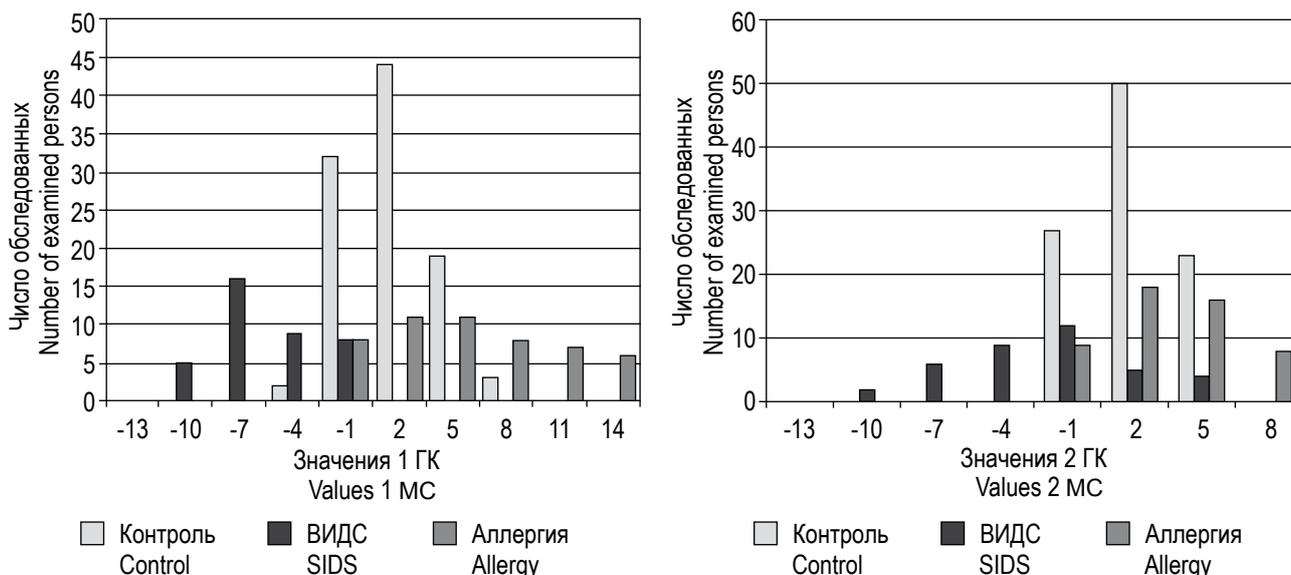


Рисунок 1. Распределение индивидуальных показателей 1ГК (относительного и абсолютного числа субпопуляций Т-лимфоцитов и В-клеток) в обследуемых группах

Figure 1. Distribution of individual parameters 1MC (imunoregulatory index, T helpers, cytotoxic T cells) in the groups under study

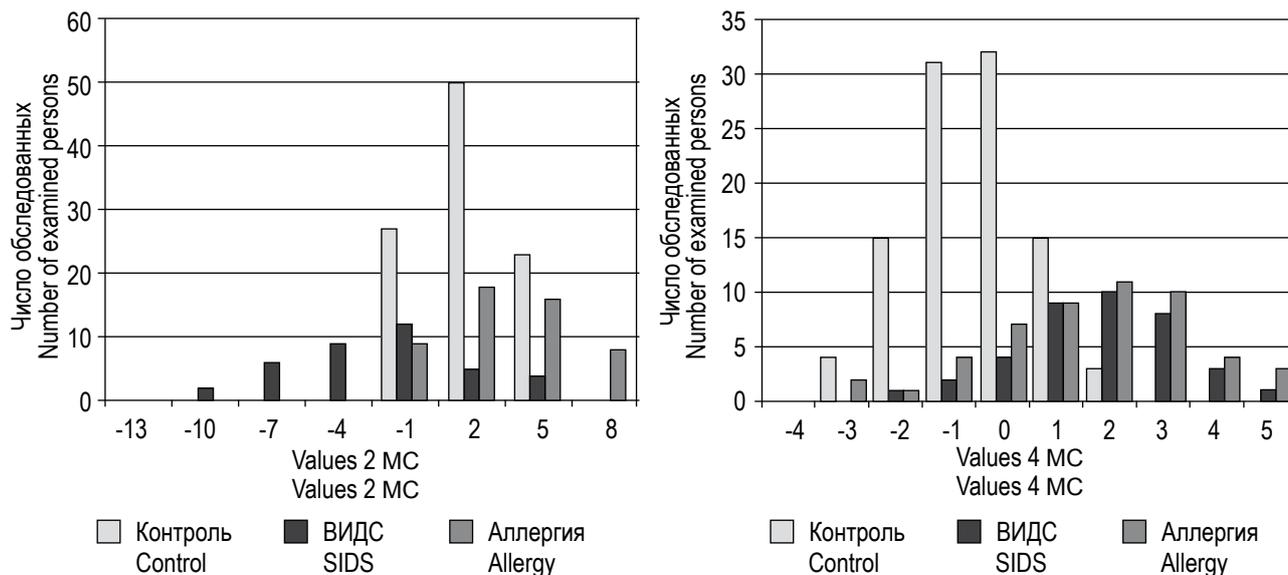


Рисунок 2. Распределение индивидуальных показателей 2ГК (иммунорегуляторного индекса, Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов) в обследуемых группах

Figure 2. Distribution of individual parameters 2MC (immunoregulatory index, T helpers, cytotoxic T cells) in the groups under study

При ВИДС среднее значение 1ГК ($M = -7,1$) отклонялось в область отрицательных величин по сравнению с нормой ($M = 0,16$), а при аллергических заболеваниях — в область положительных значений ($M = 4,98$). Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования этого показателя для дифференцированной оценки общих групповых и индивидуальных различий, затрагивающих количественную характеристику Т- и В-клеточного звеньев иммунитета.

При ВИДС более чем у 43% обследованных пациентов значения относительного и абсолютного содержания иммунокомпетентных клеток были ниже, чем в референсной группе, а при аллергии у 92% пациентов значительно превышали норму.

Показатели 2ГК, характеризующие роль содержания и различного соотношения субпопуляций $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, распределялись аналогичным образом (рис. 2).

Среднее значение 2ГК (M) контрольной группы составляло 0,42, при ВИДС -3,79, при аллергии 2,03. Полученные результаты выявляют индикаторные показатели при ВИДС и аллергии, значимо отличающиеся между собой, и в меньшей степени от нормы. При ВИДС у 45% обследованных пациентов соотношение $CD4^+$ Т-клеток и $CD8^+$ Т-лимфоцитов было гораздо ниже, чем в референсной группе и около 80% имели показатели ниже, чем при аллергии. Эффект обусловлен значительным снижением субпопуляции $CD4^+$ Т-клеток, что согласуется с ранее установленными результатами. При аллергии у 47% пациентов соотношение $CD4^+/CD8^+$ Т-лимфоцитов значительно превышало норму, и у 80% было выше, чем при ВИДС, что связано с повышением числа Т-хелперных и/или снижением Т-цитотоксических субпопуляций лимфоцитов.

Расширение иммунологических параметров, подразделяющее «пантеоны» $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоциты на минорные популяции, такие как регуляторные Т-клетки, наивные и клетки памяти и др., в дальнейшем прояснит их вклад в значимость уровней и соотношения субпопуляций Т-лимфоцитов ($CD4^+$ и $CD8^+$). В настоя-

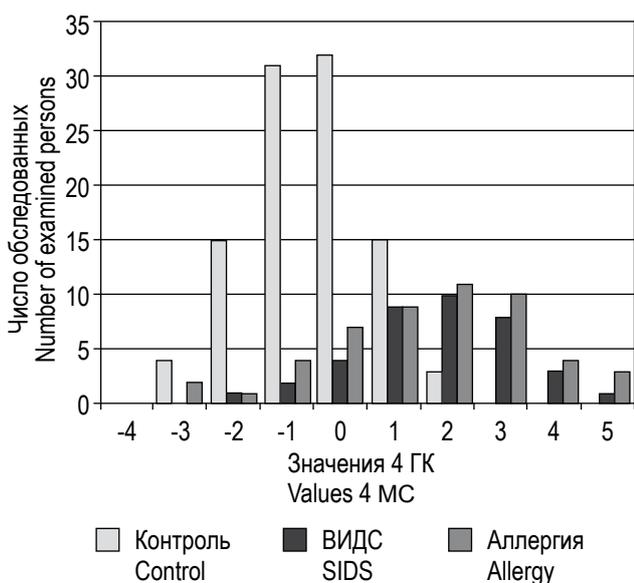


Рисунок 3. Распределение индивидуальных показателей 4ГК (активированных Т-лимфоцитов) в обследуемых группах

Figure 3. Distribution of individual parameters 4MC (activated T cells) in the groups under study

шее время их участие в развитии инфекционных, аутоиммунных, аллергических процессах и опухолемом росте изучается и описано в ряде исследований [3, 6, 10].

Распределение значений, характеризующих вклад активированных лимфоцитов в состояние иммунитета, представленное 4ГК, при аллергии и ВИДС отличалось от нормы (рис. 3).

Различий между патологиями не было выявлено. И для аллергии, и для ВИДС характерной особенностью является повышение активации Т-лимфоцитов. При обеих патологиях средние значения превышали норму более чем у 55% пациентов. Различия между нормой и группами с патологией статистически значимы ($t_{\text{контр./ВИДС}} = 8,4$; $t_{\text{контр./аллерг.}} = 6,95$, $p < 0,01$).

По остальным комплексам, характеризующим состояние иммунитета, не выявлено различий в распределении индивидуальных значений практически здоровых людей и пациентов с иммунодефицитными состояниями и аллергическими заболеваниями.

Заключение

Таким образом, применение метода многофакторного анализа для характеристики состояния иммунитета дает возможность свести множество характеристик иммунитета к значительно меньшему ряду обобщающих факторов. Они представляют собой независимые комбинации иммунологических показателей и отражают количество и функциональное состояние разных типов иммунокомпетентных клеток. Последовательность выделения комплексов отражает их вклад (значимость) в общей характеристике иммунитета. Восемь из них наиболее информативны, т. к. объединяют 80% содержащейся информации. Четыре из них отражают роль количества и соотношения разных типов иммунокомпетентных клеток (Т-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, соотношения Т-хелперов и Т-цитотоксических лимфоцитов, В- и НК-лимфоцитов), остальные – функциональную активность. Выделенные комплексы характеризуют реально существующие связи между показателями и их иерархию.

Продемонстрирована возможность применения метода многофакторного моделирования для дифференцирования вторичных им-

мунодефицитных состояний от аллергического синдрома. Три комплекса позволяют различать эти состояния между собой и в меньшей степени от нормы для значительного числа обследованных пациентов. Первый комплекс отражает роль абсолютного числа Т- и в меньшей степени В-клеток (сниженного при иммунодефицитных состояниях, повышенного при аллергических заболеваниях). Второй показывает аналогичные изменения процента $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов и их соотношения. Настоящее исследование выявляет значимость этих показателей, которая, возможно, определяется ролью малых регуляторных популяций Т-лимфоцитов, формирующих состав $CD4^+$ и $CD8^+$ Т-лимфоцитов, регулирующих тип и высоту иммунного ответа, фенотипически и функционально охарактеризованных в последние десятилетия. Особенностью четвертого комплекса является повышение числа активированных Т-клеток как при ВИДС, так и при аллергиях.

Использование многофакторного анализа подтверждает важную роль взаимосвязи абсолютного числа разных типов лимфоцитов: Т-клеток, Т-хелперов, Т-цитотоксических лимфоцитов, степени активации Т-клеток в развитии иммунодефицитных состояний и аллергических заболеваний; и несколько меньшую значимость числа В-клеток и НК-клеток.

Эти результаты свидетельствуют о целесообразности применения МГК для оценки состояния иммунитета. Представление материала в более компактном, сгруппированном виде позволяет извлечь больший объем информации из анализируемых данных, выявить скрытые связи между показателями, формирующими комплексы (главные компоненты), и определить вклад каждого комплекса в общее состояние иммунитета.

Выполненные исследования позволяют рассматривать формирующиеся комплексы в качестве ключевых обобщающих характеристик иммунитета [5]. На основе их анализа сделан вывод об особенностях функционирования иммунитета при аллергиях и иммунодефицитных состояниях, позволяющих дифференцировать их между собой. Многофакторный анализ состояния иммунитета значительно расширяет диагностические и исследовательские возможности.

Список литературы / References

1. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / Пер. с англ. Ю.А. Данилова. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glantz S. Medicobiological statistics (English Transl. Yu.A. Danilov)]. Moscow: Practice, 1998. 459 p.
2. Дубровская Л.И., Князев Г.Б. Компьютерная обработка естественно-научных данных методами многомерной прикладной статистики. Томск: ТМЛ-Пресс, 2011. 120 с. [Dubrovskaya L.I., Knyazev G.B.

Computer processing naturally scientific data by methods of multidimensional applied statistics]. Tomsk: TML-Press 2011. 120 p.

3. Реброва О.Ю. Статистический анализ медицинских данных. М.: МедиаСфера, 2006. 312 с. [Rebrova O. Yu. Statistical analysis of medical data]. Moscow: MediaSfera, 2006. 312 p.

4. Сарап П.В., Винник Ю.С., Останин А.А. Использование факторного анализа для оценки показателей иммунного статуса больных с хирургической патологией // Современные наукоемкие технологии, 2009. № 3. С. 84-85. [Sarap P.V., Vinnik Yu.S., Ostanin A.A. Use of the factorial analysis for an assessment of indicators of the immune status of patients with surgical pathology. *Sovremennye naukoemkie tekhnologii = Modern High Technologies*, 2009, no. 3, pp. 84-85. (In Russ.)]

5. Халафян А.А. Учебник STATISTICA 6 Статистический анализ данных. М.: Бином, 2007. 503 с. [Khalafyan A.A. Textbook STATISTICA 6 Statistical analysis of data]. Moscow: Binom, 2007. 503 p.

6. Чепелева М.В. Факторный анализ в оценке состояния клеточного иммунитета у пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями длинных трубчатых костей и крупных суставов // Клиническая лабораторная диагностика, 2013. № 11. С. 41-45. [Chepeleva M.V. The factorial analysis in evaluation of cell immunity of patients with pyo-inflammatory diseases of long bones and large joints. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika = Russian Clinical Laboratory Diagnostics*, 2013, no. 11, pp. 41-45. (In Russ.)]

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

Авторы:

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

Зацаренко С.В. — научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, г. Обнинск, Россия

Authors:

Kuzmina E.G., PhD (Biology), Head, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Research Radiological Centre, Obninsk, Russian Federation

Zatsarenko S.V., Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre — Branch of the National Research Radiological Centre, Obninsk, Russian Federation

Поступила 20.09.2016

Отправлена на доработку 26.12.2016

Принята к печати 07.02.2017

Received 20.09.2016

Revision received 26.12.2016

Accepted 07.02.2017

ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ПЛАЦЕНТОЙ, НА ФОРМИРОВАНИЕ СОСУДОПОДОБНЫХ СТРУКТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА

**Соколов Д.И.^{1,3}, Белякова К.Л.¹, Михайлова В.А.^{1,3}, Шиленкова Ю.В.¹,
Худинян М.М.¹, Окорокова Л.С.¹, Беликова М.Е.², Сельков С.А.¹**

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

² СПб ГБУЗ «Городская больница № 26, Санкт-Петербург, Россия

³ ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. Клетки трофобласта активно взаимодействуют с эндотелиальными клетками, участвуя в формировании сосудов в зоне маточно-плацентарного контакта и ремоделировании спиральных артерий матки. Продукция цитокинов клетками плаценты закономерно изменяется от первого к третьему триместру физиологической беременности; она также изменяется в зависимости от наличия акушерской патологии, например при преэклампсии. В настоящее время нет данных о влиянии как отдельных цитокинов, так и факторов, секретируемых плацентой, на взаимодействие ЭК и трофобласта. Поэтому целью настоящего исследования явилась оценка факторов, секретируемых плацентой, на формирование сосудоподобных структур эндотелиальными клетками в присутствии трофобласта.

Проводили совместное культивирование эндотелиальных клеток линии EA.Hy926 и клеток трофобласта линии JEG-3 на трехмерном коллагеновом матриксе «Matrigel» (BD, США) в присутствии факторов, секретируемых плацентой женщин с физиологической беременностью на сроке 9-11 недель (n = 15), женщин с физиологической беременностью на сроке 38-39 недель (n = 15), женщин с беременностью, осложненной преэклампсией на сроке 38-39 недель (n = 14).

Установлено, что клетки трофобласта модифицируют способность эндотелиальных клеток образовывать сосуды только в условиях физиологически протекающей беременности. При преэклампсии клетки трофобласта не способны скорректировать поведение эндотелиальных клеток и обеспечить физиологический рост сосудов.

Ключевые слова: трофобласт, эндотелий, ангиогенез, плацента, цитокины, преэклампсия

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) 323-75-45, 328-98-50.
Факс: 8 (812) 323-75-45.
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) 323-75-45, 328-98-50.
Fax: 7 (812) 323-75-45.
E-mail: falcojugger@yandex.ru

Образец цитирования:

Д.И. Соколов, К.Л. Белякова, В.А. Михайлова, Ю.В. Шиленкова, М.М. Худинян, Л.С. Окорокова, М.Е. Беликова, С.А. Сельков «Влияние факторов, секретируемых плацентой, на формирование сосудоподобных структур эндотелиальными клетками в присутствии клеток трофобласта» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 285-292.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-285-292

For citation:

D.I. Sokolov, K.L. Belyakova, V.A. Mikhailova, Yu.V. Shilenkova, M.M. Khudinyan, L.S. Okorokova, Belikova M.E., S.A. Selkov "Effects of placental factors upon development of tubular structures by endothelial cells in presence of trophoblastic cells", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 285-292. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-285-292

EFFECTS OF PLACENTAL FACTORS UPON DEVELOPMENT OF TUBULAR STRUCTURES BY ENDOTHELIAL CELLS IN PRESENCE OF TROPHOBLASTIC CELLS

Sokolov D.I.^{a,c}, Belyakova K.L.^a, Mikhailova V.A.^{a,c}, Shilenkova Yu.V.^a, Khudinyan M.M.^a, Okorokova L.S.^a, Belikova M.E.^b, Selkov S.A.^a

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

^b St. Petersburg City Hospital No. 26, St. Petersburg, Russian Federation

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

Abstract. Trophoblast cells actively interact with endothelial cells participating in the process of vasculogenesis in the uterus/placenta contact area and remodeling of uterine spiral arteries. Cytokine production by the placental cells is subject to gradual changes from the 1st to 3rd trimester of physiological pregnancy. It is also changed in cases of obstetric disorders, e.g., in pre-eclampsia. At present time, there are lacking data on effects of cytokines and placenta-derived factors upon local interactions between endothelium and trophoblast cells. Hence, the aim of our study was to assess the influence of placental factors upon formation of tube-like structures by endothelial cells in presence of trophoblastic cells. We performed co-cultures of Ea.Hy926 endothelial cell line and Jeg-3 trophoblastic cells in a 3-D collagen matrix («Matrigel», BD, USA) with secretable factors from placentas of healthy pregnant women at 9-11 weeks of gestation (n = 15), healthy pregnant women at 38-39 weeks of gestation (n = 15), or the women with preeclampsia at 38-39 weeks of gestation (n = 14).

We have shown that the trophoblastic cells may modify the ability of endothelial cells to form tube-like structures only with placental factors from health pregnant women. In pre-eclampsia condition, the trophoblast cells are not able to correct the behavior of endothelial cells, and to promote physiological growth of blood vessels.

Keywords: trophoblast, endothelium, angiogenesis, placenta, cytokines, pre-eclampsia

Introduction

Appropriate fetus development during pregnancy depends on the successful formation of maternal-fetal contact, interactions between trophoblast cells and cellular microenvironment including interactions with uterine endothelial cells (EC) during spiral arteries remodeling [23], placental and decidual vessels network. Endometrium decidualization in the beginning of pregnancy is associated with invasion of trophoblast, changes in qualitative and quantitative leucocyte composition of the decidua, changes in functional state of endometrial and decidual cells, stimulation of angiogenesis and lymphangiogenesis in endometrium, decidua and placenta [18, 38], changes in cytokine and cellular microenvironment.

During invasion into the endometrium trophoblast cells differentiate into two cell types – syncytiotrophoblast covering villi outside and cytotrophoblast with proliferative activity differentiating into invasive (extravillous) trophoblast capable of invasion in interstitial direction (uterine myometrium with the formation of giant cells) and endovascular direction (uterine spiral arteries) [13]. The result of the remodeling of uterine spiral arteries is the dilated blood vessels that do not have the ability to dilate that increases the blood flow to the villi in the second trimester of pregnancy. Invasion of

trophoblast cells is accompanied by the destruction of the extracellular matrix by MMP-2, MMP-3, MMP-9 and cathepsins simultaneously with the secretion of their inhibitors – TIMP-1 and TIMP-2 [13]. Lack of trophoblast cells invasion can cause complications during pregnancy (miscarriage, preeclampsia, intrauterine growth retardation [31]), the excessive invasion on the contrary may be a condition for the development of choriocarcinoma [14]. During the trophoblast invasion cells lose their ability to proliferate [35, 39]. When migrating into decidua invading cells interact with decidual stromal cells, epithelial cells and maternal immune cells. Cytokines secreted by cells of microenvironment shift the equilibrium in secretion of proteases and their inhibitors in different ways: IFN γ decreases secretion of metalloproteases, IL-12 inhibits the secretion of proteases and stimulates the secretion their inhibitors [1]. bFGF also suppresses the invasion of trophoblast by stimulation of TIMP-1 secretion and inhibition of MMP-9 secretion [33]. At the same time, HGF enhances the trophoblast invasion by stimulating the secretion of MMP [14, 37]. EGF has a similar effect by stimulating the production of MMP-2 [41] and MMP-9 [36] by trophoblast, but simultaneously EGF stimulates the production of TIMP-1 by trophoblast cells, thereby implementing the regulation by principle of negative feedback [36]. Uterine spiral arteries remodeling

comes in several stages [13, 27, 28]. Firstly, the changes based on the activation of the renin-angiotensin system of mother [43] and activation of decidual NK-cells and macrophages [40] are observed, which are accompanied by vacuolization and basophilia of EC and an increase of the lumen [19]. Further interstitial trophoblast vascular remodeling occurs accompanied by apoptosis of smooth muscle cells and deposition of fibrinoid at the site of elastic and collagen fibers due to the production of MMP-2 MMP-7 and MMP-9 by trophoblast, decidual macrophages and NK-cells [24]. Finally, it ends with vessel walls infiltration by trophoblast cells due to induction of EC apoptosis and their replacement [8]. Trophoblast acquires endovascular phenotype: expression of E-cadherin, $\alpha 1\beta 4$ integrin decreases, expression of VE-cadherin, VCAM-1, PECAM1, integrin $\alpha 1\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha 4\beta 1$ increases [46]; trophoblast cells form contacts with EC with the help of VE-cadherin [11]. The invasion of trophoblast, the remodeling of spiral arteries, the interactions of trophoblast and EC are controlled by cells of microenvironment with various soluble factors secreted. Interaction of trophoblast cells and EC is amplified by the action of pro-inflammatory cytokines TNF α and IL-1 β secreted by cells of microenvironment because of expression stimulation of $\alpha 4\beta 1$ and VCAM-1 [12]. In the presence of IFN γ or elevated concentrations of TNF α the ability of trophoblast to integrate into EC monolayer decreases [16]. VEGF family factors stimulate the expression of integrin $\alpha v\beta 3$ [20] and are chemoattractants for trophoblast cells [32] that indicates their important role in the remodeling of uterine spiral arteries. VEGF-A also stimulates the proliferation and increases trophoblast viability [9], and VEGF-C reduces the cytotoxicity of NK-cells to trophoblast [26]. TGF beta, unlike the majority of the growth factors, inhibits trophoblast cells proliferation [30], stimulates their adhesion, but inhibits the invasion [45] and stimulates the secretion of VEGF by trophoblast cells [17].

Cytokine production by placental cells naturally varies from the first to the third trimester of healthy pregnancy; it also varies depending on the presence of obstetric pathology, such as preeclampsia [2, 3, 4]. There is currently no data on the impact of individual cytokines and factors secreted by placenta, on EC and trophoblast interaction. Therefore, the aim of this study was to evaluate the factors secreted by placenta on the formation of tube-like structures by endothelial cells in the presence of trophoblast.

Materials and methods

Cell lines

Cell line EA.Hy926 used in the experiment reproduces all main features of endothelial cells. Cells were cultured in culture medium DMEM/F12 with

addition of 10% fetal bovine serum (FBS), 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of streptomycin, 100 U/ml of penicillin, 8 mmol/L of L-glutamine, HAT (Sigma, USA). Reseeding was produced one time every 3-4 days, causing the disintegration of monolayer by five-minute exposition in versene solution (Biolot, Russia). Trophoblast cell line JEG-3 reproduce all main features of the invasive type of trophoblast. Cells were cultured in culture medium DMEM, 10% FBS, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin, 100 U/l penicillin, 2 mmol/L L-glutamine, 1% non-essential amino acids, 10 mM sodium pyruvate (Sigma, USA). Reseeding was produced one time in 3-4 days, causing the disintegration of monolayer by five-minute exposition in solution containing 0.135% trypsin and 0.01% EDTA (Biolot, Russia).

Obtaining placentas conditioned media

Placentas were obtained: 1) after induced abortion at normal 1st-trimester between 9-11 weeks ($n = 15$); 2) after caesarean-delivery at normal 3rd-trimester between 38-39 weeks ($n = 15$); 3) after caesarean-delivery at preeclampsial 3rd-trimester between 38-39 weeks ($n = 15$). The age of women varied from 18 to 37 years with an average of 31.6 ± 4.2 years. The exclusion criteria for the pregnant women included: (i) type I diabetes mellitus, (ii) polyhydramnios, (iii) oligohydramnios, (iv) urogenital infection, (v) acute infection, or (vi) exacerbation of chronic infection, hypertension and other diseases of the circulatory system. Groups of pregnant women were matched for age, parity births and obstetric history. The diagnosis of preeclampsia in pregnant women was established on the basis of the main clinical symptoms – the presence of proteinuria, oedema, and hypertension. Fragments (weight 100 ± 11 mg) from the central part of the placenta were cultured for 24 hours in 1 ml DMEM/F12 medium (Sigma, USA) with no added FBS. Then, the conditioned media were collected, frozen and stored at temperature -20 °C until the study.

Evaluation of the secreted placental factors influence on the formation of tube-like structures by EC in the presence of trophoblast cells

In wells of a 24-well plate pretreated with Matrigel Growth Factor Reduced matrix (BD, USA), we added 400 μl of placental conditioned DMEM/F12 medium (three wells for each sample), 25 μl of FBS (Sigma, USA). Then to each well we added EC of EA.Hy926 line at a concentration 175 000 (in 300 μl of DMEM/F12 medium) and 75 000 trophoblast cells of JEG-3 line (in 300 μl DMEM / F12 medium) previously stained with green fluorescent vital dye CalceinAM (Sigma, USA). To control wells we added 300 μl of DMEM medium, 2,5% FBS without cells of JEG-3 line. Then we performed the incubation for 24 hours (37 °C, 4.5% CO $_2$). As a control ($n = 15$) we assessed the formation of tube-like structures by EC in the absence of trophoblasts. At that the number of

tube-like structures formed by EC of EA.Hy926 line in coculture with trophoblastic cell line JEG-3 (30 ± 1 , $n = 15$) was lower than in culture in the absence of JEG-3 cell line (37 ± 1 , $p < 0.001$). The length of tube-like structures formed by EC of line EA.Hy926 was similar ($105.75 \pm 0.52 \mu\text{m}$) both at monoculture and during cocultivation with JEG-3 cell line. As a level of spontaneous formation of tube-like structures we assessed tube-like structures formed in the presence of trophoblast cells in a medium containing 2.5% FBS (the spontaneous level, Figure 1A – see p. 3 of the cover). The level of tube-like structures formation by EC in the presence of trophoblast cells and IFN γ (1000 U/ml, $n = 15$) served as a positive control. The length of tube-like structures was longer (133.02 ± 3.91 , $p < 0.001$) than in culture in the absence of IFN γ (105.75 ± 0.52). With AxioObserver.Z1 microscope and computer image analysis system AxioVision (Zeiss, Germany) 5 fields of view per well were taken into account. We assessed the number of formed tube-like structures and their length in micrometers. Statistical analysis was performed using computer program Statistical10. For data analysis, we used the nonparametric Mann–Whitney test.

Results and discussion

In the presence of conditioned media of placentas from women with healthy pregnancy on 9-11 weeks of gestation we observed an increase in the length of tube-like structures formed by EC of EA.Hy926 line in the presence of trophoblast cells of JEG-3 line, comparing with a spontaneous level of their formation. We also marked the reduction in the number of tube-like structures formed by EC of EA.Hy926 line in the presence of trophoblast cells of JEG-3 line (Table 1, Figure 1 – see p. 3 of the cover). In the presence of conditioned media of placentas from women with healthy pregnancy (38-39 weeks of gestation) we observed an increase in the length of tube-like structures formed by EC of EA.Hy926 line in the presence of trophoblast cells of JEG-3 line comparing with the level of their spontaneous formation. We also marked the reduction in the number of tube-like structures formed by EC of EA.Hy926 line in the presence of trophoblast cells of JEG-3 line as compared with the spontaneous level of their formation, and in comparison with the culturing in the presence of conditioned media of placentas from women in the early stages (9-11 weeks) of healthy pregnancy (Table 1, Figure 1 – see p. 3 of the cover). Thus, the effects of conditioned media of placentas from women at early and late pregnancy are different. Conditioned media of placentas from women at early pregnancy stimulate the formation of more tube-like structures comparing with conditioned media of placentas from women at late pregnancy. This fact is in favor of changing of the cytokines and growth factors balance

in placenta depending on the gestation age and the predominance of non-branching angiogenesis in late healthy pregnancy and corresponds to the data present in the literature [44]. Previously in our laboratory we performed the study of cytokine secretion by placenta which showed the increased production of pro-angiogenic factors (VEGF, bFGF, MMP-2, PDGF, Ang-2) in the first trimester of healthy pregnancy comparing with the third trimester [3]. The increased secretion of MMP-2, Ang-2, acting collaboratively with VEGF, in the first trimester of pregnancy [4, 21], stimulates extracellular matrix destruction, decreases intercellular adhesion, providing vessel destabilization, as well as stimulating the migration and proliferation of EC. Destabilizing effect is required for the formation of new vessels branches and increases the sensitivity of EC to various angiogenic factors such as VEGF, promoting stimulation of branching angiogenesis, and, consequently, meeting the needs of the growing fetus with oxygen and nutrients. At the third trimester of pregnancy there is a reduction of angiogenic factors, including Ang-2, and increasing of Ang-1 production by placental cells [4], that favors the termination of vascular network formation and provides switching of branching angiogenesis to non-branching angiogenesis.

Previously in our laboratory we conducted the experiments on evaluation of the effect of conditioned media of placentas from women with early pregnancy on the formation of tube-like structures by EC in the absence of other cell types. EC formed shorter tube-like structures compared with spontaneously formed tube-like structures, but their number was significantly higher than the number of spontaneously formed tube-like structures, indicating the physiological process of branching angiogenesis [34]. The presence of trophoblast cells surrounding EC modifies their behavior – the length of tube-like structures formed by EC increases significantly while preserving the ability to form a greater number of tube-like structures than in the presence of conditioned media of placentas from women in third trimester of healthy pregnancy. These results are consistent with the literature on switching of angiogenesis mechanisms from branching angiogenesis in the first trimester of pregnancy to non-branching angiogenesis in the third trimester of pregnancy [10]. Given that trophoblast cells are able to acquire an endothelial phenotype [11, 46], as well as incorporate into tube-like structures (Figure 1 – see p. 3 of the cover) we can expect their active participation in the development of decidua vascular network; these data are also in agreement with previously described trophoblast role in remodeling of uterine spiral arteries [8, 13, 46]. We could not find in the literature data on the nature of the interaction between EC in such co-cultivation systems, so the question of the ability of trophoblast cells to form

TABLE 1. THE EFFECT OF CONDITIONED MEDIA OF PLACENTAS FROM WOMEN ON THE TUBE-LIKE STRUCTURES FORMATION BY EC OF EA.Hy926 LINE IN THE PRESENCE OF TROPHOBLAST CELLS OF JEG-3 LINE

Cell culturing conditions	The length of tube-like structures, μm	The number of tube-like structures
DMEM/F12, 2,5% (the spontaneous level)	100.58 [83.37; 120.95]	29 [22; 37]
conditioned media of placentas from healthy pregnancy (9-11 weeks of gestation, group 1)	117.58 [95.71; 145.14]***	26 [19.5; 33]*
conditioned media of placentas from healthy pregnancy (38-39 weeks of gestation, group 2)	118.74 [96.91; 149.72]***	23 [15; 31]*** †
conditioned media of placentas from pregnancy with preeclampsia (38-39 weeks of gestation, group 3)	135.84 [111.94; 161.43]*** ###	18 [13; 24]*** #

Note. The significance of differences between groups: the length or the number of tube-like structures in the presence of conditioned media is different from the spontaneous level * – $p < 0.05$; *** – $p < 0.001$; the number of tube-like structures in the presence of conditioned media of placentas from women of group 2 is different from the number in group 1 – $p < 0.05$; the length or the number of tube-like structures in the presence of conditioned media of placentas from women of group 3 is different from the length or the number in group 2 † – $p < 0.05$, ### – $p < 0.001$.

tube, as it was described for the EC [7, 22], or act like pericytes remains open.

In the presence of conditioned media of placentas from women with pregnancies complicated with preeclampsia (38-39 weeks) we observed an increase in the length of tube-like structures formed by EC of EA.Hy926 line in the presence of trophoblast cells of JEG-3 line. At the same time in the presence of conditioned media of placentas from women with pregnancy complicated with preeclampsia (38-39 weeks) we observed a decrease in the number of tube-like structures formed by EC of EA.Hy926 line in the presence of trophoblast cells of JEG-3 line comparing both with the level of their spontaneous formation and with the culturing in the presence of conditioned media of placentas from women in the late stages (38-39 weeks) of healthy pregnancy (Table 1, Figure 1 – see p. 3 of the cover). Thus, the conditioned media of placentas from women with preeclampsia have pronounced stimulating effects in increasing the length of tube-like structures formed by EC along with reducing their number when cocultured with trophoblast. This fact is in favor of changing the balance of cytokines and growth factors in placenta in case of pre-eclampsia and the predominance of the processes non-branching angiogenesis at preeclampsia. Earlier we registered the similar result in experiments on assessment the effects of conditioned media of placentas from women with preeclampsia on tube-like structures formation by EC in the absence of other types of cells [34]. This fact is in favor of an significant reduction of vessels branching and the predominance of non-branching angiogenesis in preeclampsia comparing with healthy pregnancy in the absence and in the presence of trophoblast cells. These data also point to the failure of trophoblast cells to change the behavior of EC

towards the physiological vascular growth when pro-inflammatory and anti-angiogenic factors prevail in the external cytokine microenvironment. Probably during pathological processes in the area of utero-placental contact endovascular trophoblast cells behave in a similar to EC way [5, 42], reducing the migration and proliferation activity [6]. In this case, we also cannot exclude an increased cytotoxic activity of trophoblast cells, which are capable of inducing apoptosis of EC [38]. Trophoblast cells express FasL and secrete its soluble form – sFasL, which interaction with Fas molecule expressed on EC [15, 25] leads to the apoptosis of EC. The development of TRAIL-dependent EC apoptosis was also shown [29]. These mechanisms may also be involved in reducing the number of tube-like structures formed by EC cell in the presence of conditioned media of women's placentas.

Conclusion

Thus, soluble factors contained in the conditioned media of placentas from women in the first and third trimester of healthy pregnancy and pregnancy complicated with preeclampsia change the characteristics of the vascular network formed by EC in the presence of trophoblast cells. Conditioned media of placentas from women in the first trimester of healthy pregnancy stimulate branching angiogenesis, while conditioned media of placentas from women in the third trimester of healthy pregnancy stimulate non-branching angiogenesis. The presence of trophoblast cells surrounding EC modifies EC behavior that is in favor of their active participation in the processes of decidual and placental vascular network formation. In case of preeclampsia trophoblast cells are not able to correct the behavior of EC and enable the physiological growth of blood vessels.

Список литературы / References

1. Айламазян Э.К., Степанова О.И., Сельков С.А., Соколов Д.И. Клетки иммунной системы матери и клетки трофобласта: «Конструктивное сотрудничество» ради достижения совместной цели // Вестник Российской академии медицинских наук, 2013. Т. 11. С. 12-21. [Ailamazian E.K., Stepanova O.I., Selkov S.A., Sokolov D.I. Cells of immune system of mother and trophoblast cells: constructive cooperation for the sake of achievement of the joint purpose. *Vestnik Rossiyskoy akademii meditsinskikh nauk = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2013, Vol.11, pp. 12-21. (In Russ.)]
2. Соколов Д.И., Колобов А.В., Лесничия М.В., Боля К.В., Селютин А.В., Аржанова О.Н., Кветной И.М., Сельков С.А., Айламазян Э.К. Продукция тканью плаценты проангиогенных и антиангиогенных факторов // Молекулярная медицина, 2009. № 2. С. 49-53. [Sokolov D.I., Kolobov A.V., Lesnichiya M.V., Bolia K.V., Seliutin A.V., Arzhanova O.N., Kvetnoy I.M., Selkov S.A., Ailamazian E.K. The production of proangiogenic and antiangiogenic factors by placental tissue. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2009, no. 2, pp. 49-53. (In Russ.)].
3. Соколов Д.И., Лесничия М.В., Селютин А.В., Климова В.А., Аржанова О.Н., Сельков С.А. Роль цитокинов в контроле развития плаценты в норме и при гестозе // Иммунология, 2009. № 1. С. 22-26. [Sokolov D.I., Lesnichnaya M.V., Selyutin A.V., Klimova V.A., Arzhanova O.N., Selkov S.A. The role of cytokines in the control of placental development in norm and in eclampsia. *Immunologiya = Immunology*, 2009, no. 1, pp. 22-26. (In Russ.)]
4. Соколов Д.И., Сельков С.А. Иммунологический контроль формирования сосудистой сети плаценты. СПб.: Издательство Н-Л, 2012. 206 с. [Sokolov D.I., Selkov S.A. Immunological control of the development of the placenta vasculature]. St. Petersburg: Publishing House N-L, 2012, 206 p.
5. Степанова О.И., Фураева К.Н., Николаенков И.П., Сельков С.А., Соколов Д.И. Влияние факторов, секретируемых тканью плаценты, на пролиферативную активность эндотелиальных клеток линии EA.hy926 // Журнал акушерства и женских болезней, 2012. Т. LXI, № 5. С. 80-84. [Stepanova O.I., Furayeva K.N., Nikolayenkov I.P., Selkov S.A., Sokolov D.I. Secretory placental factors influence to endothelial cells EA.hy926 proliferation. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Gynecology*, 2012, Vol. LXI, no. 5, pp. 80-84. (In Russ.)]
6. Фураева К.Н., Степанова О.И., Овчинникова О.М., Вязьмина Л.П., Баженов Д.О., Капустин Р.В., Крамарева Н.Л., Сельков С.А., Соколов Д.И. Пролиферативная и миграционная активность клеток трофобласта при преэклампсии // Акушерство и гинекология, 2015. № 5. С. 49-55. [Furaeva K.N., Stepanova O.I., Ovchinnikova O.M., Viazmina L.P., Bazhenov D.O., Kapustin R.V., Kramareva N.L., Selkov S.A., Sokolov D.I. Proliferative and migratory activity of trophoblast cells in preeclampsia. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology*, 2015, no. 5, pp. 49-55. (In Russ.)]
7. Arnaoutova I., George J., Kleinman H.K., Benton G. The endothelial cell tube formation assay on basement membrane turns 20: state of the science and the art. *Angiogenesis*, 2009, Vol. 12, no. 3, pp. 267-274.
8. Ashton S.V., Whitley G.S., Dash P.R., Wareing M., Crocker I.P., Baker P.N., Cartwright J.E. Uterine spiral artery remodeling involves endothelial apoptosis induced by extravillous trophoblasts through Fas/FasL interactions. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2005, Vol. 25, no. 1, pp. 102-108.
9. Athanassiades A., Hamilton G.S., Lala P.K. Vascular endothelial growth factor stimulates proliferation but not migration or invasiveness in human extravillous trophoblast. *Biol. Reprod.*, 1998, Vol. 59, no. 3, pp. 643-654.
10. Benirschke K., Kaufmann P., Baergen R. Pathology of the human placenta. New York: Springer-Verlag, 2006. 1050 p.
11. Bulla R., Villa A., Bossi F., Cassetti A., Radillo O., Spessotto P., De Seta F., Guaschino S., Tedesco F. VE-cadherin is a critical molecule for trophoblast-endothelial cell interaction in decidual spiral arteries. *Exp. Cell Res.*, 2005, Vol. 303, no. 1, pp. 101-113.
12. Cartwright J.E., Balarajah G. Trophoblast interactions with endothelial cells are increased by interleukin-1beta and tumour necrosis factor alpha and involve vascular cell adhesion molecule-1 and alpha4beta1. *Exp. Cell Res.*, 2005, Vol. 304, no. 1, pp. 328-336.
13. Cartwright J.E., Fraser R., Leslie K., Wallace A.E., James J.L. Remodelling at the maternal-fetal interface: relevance to human pregnancy disorders. *Reproduction*, 2010, Vol. 140, no. 6, pp. 803-813.
14. Cartwright J.E., Tse W.K., Whitley G.S. Hepatocyte growth factor induced human trophoblast motility involves phosphatidylinositol-3-kinase, mitogen-activated protein kinase, and inducible nitric oxide synthase. *Exp. Cell Res.*, 2002, Vol. 279, no. 2, pp. 219-226.
15. Chen Q., Stone P.R., McCowan L.M., Chamley L.W. Activated endothelial cells resist displacement by trophoblast *in vitro*. *Placenta*, 2007, Vol. 28, no. 7, pp. 743-747.
16. Chen Q., Stone P.R., McCowan L.M., Chamley L.W. Interaction of Jar choriocarcinoma cells with endothelial cell monolayers. *Placenta*, 2005, Vol. 26, no. 8-9, pp. 617-625.
17. Chung I.B., Yelian F.D., Zaher F.M., Gonik B., Evans M.I., Diamond M.P., Svinarich D.M. Expression and regulation of vascular endothelial growth factor in a first trimester trophoblast cell line. *Placenta*, 2000, Vol. 21, no. 4, pp. 320-324.
18. Collins M.K., Tay C.S., Erlebacher A. Dendritic cell entrapment within the pregnant uterus inhibits immune surveillance of the maternal/fetal interface in mice. *J. Clin. Invest.*, 2009, Vol. 119, no. 7, pp. 2062-2073.

19. Craven C.M., Morgan T., Ward K. Decidual spiral artery remodelling begins before cellular interaction with cytotrophoblasts. *Placenta*, 1998, Vol. 19, no. 4, pp. 241-252.
20. Fukushima K., Miyamoto S., Tsukimori K., Kobayashi H., Seki H., Takeda S., Kensuke E., Ohtani K., Shibuya M., Nakano H. Tumor necrosis factor and vascular endothelial growth factor induce endothelial integrin repertoires, regulating endovascular differentiation and apoptosis in a human extravillous trophoblast cell line. *Biol. Reprod.*, 2005, Vol. 73, no. 1, pp. 172-179.
21. Geva E., Ginzinger D.G., Zaloudek C.J., Moore D.H., Byrne A., Jaffe R.B. Human placental vascular development: vasculogenic and angiogenic (branching and nonbranching) transformation is regulated by vascular endothelial growth factor-A, angiopoietin-1, and angiopoietin-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2002, Vol. 87, no. 9, pp. 4213-4224.
22. Grant D.S., Kinsella J.L., Kibbey M.C., LaFlamme S., Burbelo P.D., Goldstein A.L., Kleinman H.K. Matrigel induces thymosin beta 4 gene in differentiating endothelial cells. *J. Cell Sci.*, 1995, Vol. 108 (Pt 12), pp. 3685-3694.
23. Gude N.M., Roberts C.T., Kalionis B., King R.G. Growth and function of the normal human placenta. *Thromb. Res.*, 2004, Vol. 114, no. 5-6, pp. 397-407.
24. Harris L.K. Review: Trophoblast-vascular cell interactions in early pregnancy: how to remodel a vessel. *Placenta*, 2010, Vol. 31, pp. S93-98.
25. Harris L.K., Keogh R.J., Wareing M., Baker P.N., Cartwright J.E., Aplin J.D., Whitley G.S. Invasive trophoblasts stimulate vascular smooth muscle cell apoptosis by a fas ligand-dependent mechanism. *Am. J. Pathol.*, 2006, Vol. 169, no. 5, pp. 1863-1874.
26. Kalkunte S.S., Mselle T.F., Norris W.E., Wira C.R., Sentman C.L., Sharma S. Vascular endothelial growth factor C facilitates immune tolerance and endovascular activity of human uterine NK cells at the maternal-fetal interface. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 182, no. 7, pp. 4085-4092.
27. Kam E.P., Gardner L., Loke Y.W., King A. The role of trophoblast in the physiological change in decidual spiral arteries. *Hum. Reprod.*, 1999, Vol. 14, no. 8, pp. 2131-2138.
28. 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.
29. Keogh R.J., Harris L.K., Freeman A., Baker P.N., Aplin J.D., Whitley G.S., Cartwright J.E. Fetal-derived trophoblast use the apoptotic cytokine tumor necrosis factor-alpha-related apoptosis-inducing ligand to induce smooth muscle cell death. *Circ. Res.*, 2007, Vol. 100, no. 6, pp. 834-841.
30. Kharfi A., Giguere Y., Sapin V., Masse J., Dastugue B., Forest J.C. Trophoblastic remodeling in normal and preeclamptic pregnancies: implication of cytokines. *Clin. Biochem.*, 2003, Vol. 36, no. 5, pp. 323-331.
31. Knofler M. Critical growth factors and signalling pathways controlling human trophoblast invasion. *Int. J. Dev. Biol.*, 2010, Vol. 54, no. 2-3, pp. 269-280.
32. Lash G.E., Warren A.Y., Underwood S., Baker P.N. Vascular endothelial growth factor is a chemoattractant for trophoblast cells. *Placenta*, 2003, Vol. 24, no. 5, pp. 549-556.
33. Luo J., Qiao F., Yin X. Hypoxia induces FGF2 production by vascular endothelial cells and alters MMP9 and TIMP1 expression in extravillous trophoblasts and their invasiveness in a cocultured model. *J. Reprod. Dev.*, 2011, Vol. 57, no. 1, pp. 84-91.
34. Lvova T.Y., Stepanova O.I., Furaeva K.N., Korenkov D.A., Sokolov D.I., Selkov S.A. Effects of placental tissue secretory products on the formation of vascular tubules by EA.Hy926 endothelial cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2013, Vol. 155, no. 1, pp. 108-112.
35. Pankaj S., Geeta G., Ravi T., Diana M., Morales-Prieto, Deepak N. Modi, Udo R. Markert, Gupta S.K. AP-1 Transcription Factors, Mucin-Type Molecules and MMPs Regulate the IL-11 Mediated Invasiveness of JEG-3 and HTR-8/SVneo Trophoblastic Cells. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, Iss. 1. doi:10.1371/journal.pone.0029745
36. Qiu Q., Yang M., Tsang B.K., Gruslin A. EGF-induced trophoblast secretion of MMP-9 and TIMP-1 involves activation of both PI3K and MAPK signalling pathways. *Reproduction*, 2004, Vol. 128, no. 3, pp. 355-363.
37. Ramanujam R., Lin Y.L., Liu J.K., He S. Regulatory expression of MMP-8/MMP-9 and inhibition of proliferation, migration and invasion in human lung cancer A549 cells in the presence of HGF variants. *Kaohsiung J. Med. Sci.*, 2013, Vol. 29, no. 10, pp. 530-539.
38. Red-Horse K., Rivera J., Schanz A., Zhou Y., Winn V., Kapidzic M., Maltepe E., Okazaki K., Kochman R., Vo K.C., Giudice L., Erlebacher A., McCune J.M., Stoddart C.A., Fisher S.J. Cytotrophoblast induction of arterial apoptosis and lymphangiogenesis in an *in vivo* model of human placentation. *J. Clin. Invest.*, 2006, Vol. 116, no. 10, pp. 2643-2652.
39. Renaud S.J., Kubota K., Rumi M.A., Soares M.J. The FOS transcription factor family differentially controls trophoblast migration and invasion. *J. Biol. Chem.*, 2014, Vol. 289, no. 8, pp. 5025-5039.
40. Smith S.D., Dunk C.E., Aplin J.D., Harris L.K., Jones R.L. Evidence for immune cell involvement in decidual spiral arteriole remodeling in early human pregnancy. *Am. J. Pathol.*, 2009, Vol. 174, no. 5, pp. 1959-1971.
41. Staun-Ram E., Goldman S., Shalev E. p53 Mediates epidermal growth factor (EGF) induction of MMP-2 transcription and trophoblast invasion. *Placenta*, 2009, Vol. 30, no. 12, pp. 1029-1036.
42. Stepanova O.I., Lvova T.Yu., Furaeva K.N., Sokolov D.I., Sel'kov S.A. Effect of Placenta Secretory Products on Migration Activity of Endothelial EA.Hy926 Cells. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2013, Vol. 156, no. 1, pp. 156-160.
43. Whitley G.S., Cartwright J.E. Trophoblast-mediated spiral artery remodelling: a role for apoptosis. *J. Anat.*, 2009, Vol. 215, no. 1, pp. 21-26.

44. Xu B., Charlton F., Makris A., Hennessy A. Nitric oxide (NO) reversed TNF-alpha inhibition of trophoblast interaction with endothelial cellular networks. *Placenta*, 2014, Vol. 35, no. 6, pp. 417-421.

45. Zhao M.R., Qiu W., Li Y.X., Zhang Z.B., Li D., Wang Y.L. Dual effect of transforming growth factor beta1 on cell adhesion and invasion in human placenta trophoblast cells. *Reproduction*, 2006, Vol. 132, no. 2, pp. 333-341.

46. Zhou Y., Fisher S.J., Janatpour M., Genbacev O., Dejana E., Wheelock M., Damsky C.H. Human cytotrophoblasts adopt a vascular phenotype as they differentiate. A strategy for successful endovascular invasion? *J. Clin. Invest.*, 1997, Vol. 99, no. 9, pp. 2139-2151.

Авторы:

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

Михайлова В.А. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел 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

Шиленкова Ю.В. — клинический ординатор отделения оперативной гинекологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

Худинян М.М. — лаборант-исследователь лаборатории межклеточных взаимодействий, отдел иммунологии и межклеточных взаимодействий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт акушерства, гинекологии и репродуктологии имени Д.О. Отта», Санкт-Петербург, Россия

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

Беликова М.Е. — к.м.н., заведующая гинекологическим отделением СПб ГБУЗ «Городская больница № 26, Санкт-Петербург, Россия

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

Authors:

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, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Shilenkova Yu.V., Clinical Resident, Department of Surgical Gynecology, D. Ott Research Institute of Obstetrics, Gynecology and Reproductology, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Belikova M.E., PhD (Medicine), Head, Department of Gynecology, St. Petersburg City Hospital No. 26, St. Petersburg, Russian Federation

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

Поступила 06.10.2016

Отправлена на доработку 10.12.2016

Принята к печати 10.01.2017

Received 06.10.2016

Revision received 10.12.2016

Accepted 10.01.2017

ТИРЕОИДНЫЙ СТАТУС И ЕГО ВЗАИМОСВЯЗЬ С ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТЬЮ ИММУНОЦИТОВ

Здор В.В.¹, Маркелова Е.В.¹, Гельцер Б.И.^{1, 2}

¹ ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

² ФГАОУ ВО «Дальневосточный федеральный университет», г. Владивосток, Россия

Резюме. Исследование патогенеза аутоиммунных заболеваний щитовидной железы, занимающих особое место в группе эндокринной патологии из-за высокой распространенности, является одной из актуальных проблем современной медицины. Триггерные механизмы их развития до сих пор неизвестны. Изменения тиреоидного статуса при нетиреоидной патологии, например при развитии “nonthyroidal syndrome”, могут запускать синтез оппоритных цитокинов иммуноцитами с последующей потерей толерантности к аутоантигенам щитовидной железы. Предполагается, что мастоциты через Toll-like receptors могут влиять на секреторную активность тиреоцитов и тем самым запускать синтез оппоритных цитокинов с последующей потерей ауто толерантности. Мастоциты, зафиксированные в щитовидной железе при ее аутоиммунной патологии, могут молекулярным способом выделения секреторного материала регулировать функциональную активность иммуноцитов и эндокриноцитов. Однако до сих пор точно неизвестно, какой из механизмов активации мастоцитов преобладает при аутоиммунных заболеваниях щитовидной железы, первично ли влияние уровня тиреоидных гормонов на данную активацию или изменения в тиреоидном статусе носят вторичный характер. Для прояснения этих вопросов в исследовании изучались особенности функционального состояния мастоцитов и продукции оппоритных цитокинов (IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α) при экспериментальном тиреотоксикозе и гипотиреозе. Для амплификации иммунного ответа одной из групп экспериментальных животных с тиреотоксикозом вводился рекомбинантный интерлейкин-2.

Специфические изменения соотношения IFN γ /IL-10 в зависимости от тиреоидного статуса свидетельствовали о значении баланса оппоритных цитокинов в развитии разных вариантов данной патологии. Достоверное увеличение Th1-маркерных цитокинов на органном уровне при тиреотоксикозе доказывает непосредственное участие тиреоидных гормонов в иммунорегуляторных процессах, что подтверждается очаговой мастоцитарной инфильтрацией щитовидной железы на фоне достоверного увеличения провоспалительных цитокинов на системном и органном уровнях. Гипотеза о возможной рецепции тиреоидных гормонов клетками иммунной системы доказана наличием интенсивных корреляций между показателями оппоритных цитокинов в органе-мишени и тиреоидными гормонами в периферическом кровотоке. Установлена регуляторная роль интерлейкина-2 в сохранении баланса оппоритных цитокинов и изменении направления вектора иммунного ответа при измененном тиреоидном статусе. На основании проведенного исследования стал более очевидным факт важной роли мастоцитов и баланса оппоритных цитокинов в патогенезе тиреоидной дисфункции. Требуется дальнейшие исследования, проясняющие механизмы взаимодействия тиреоидных гормонов и иммуноцитов.

Ключевые слова: тиреоидные гормоны, аутоантитела, оппоритные цитокины, мастоциты

THYROID STATUS AND ITS CORRELATION WITH THE FUNCTIONAL ACTIVITY OF IMMUNOCYTES

Zdor V.V.¹, Markelova E.V.^a, Geltser B.I.^{a, b}

^a Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

^b Far Eastern Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Pathogenesis studies in thyroid autoimmune diseases take a specific place among endocrine disorders, due to high prevalence of these pathologies, thus representing an urgent problem of the modern medicine. Their triggering mechanisms of their are still unknown. Changes of thyroid status in cases of non-thyroid pathology, e.g., during development of «nonthyroidal syndrome», may launch synthesis of some functionally opposite cytokines by immunocytes, with subsequent loss of tolerance to thyroid autoantigens. One

Адрес для переписки:

Здор Виктория Владимировна
ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет»
Министерства здравоохранения РФ
690002, Россия, г. Владивосток, пр. Острякова, 4.
Тел.: 8 (914) 791-96-25.
E-mail: victoria.zdor@mail.ru

Address for correspondence:

Zdor Victoria V.
Pacific State Medical University
690002, Russian Federation, Vladivostok, Ostryakov ave, 4.
Phone: 7 (914) 791-96-25.
E-mail: victoria.zdor@mail.ru

Образец цитирования:

В.В. Здор, Е.В. Маркелова, Б.И. Гельцер «Тиреоидный статус и его взаимосвязь с функциональной активностью иммуноцитов» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 293–300. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-293-300
© Здор В.В. и соавт., 2017

For citation:

V.V. Zdor, E.V. Markelova, B.I. Geltser “Thyroid status and its correlation with the functional activity of immunocytes”, *Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 293–300. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-293-300
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-293-300

may suggest that mast cells may potentially influence secretory activity of thyrocytes via Toll-like receptors, and, therefore, induce synthesis of opposite cytokines, with subsequent loss of auto-tolerance. The mast cells found in thyroid gland affected by an autoimmune disorder may also regulate functional activity of immunocytes and hormone-secreting cells due to molecular effects of secretable substances. The mechanisms prevailing in autoimmune thyroid disease are, however, widely unknown. These effects may involve either primary activation of mast cells by thyroid hormones, or secondary changes of thyroid status. To address these issues, we studied some features of mast cells response and production of functionally opposite cytokines (IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α) in experimental thyrotoxicosis and hypothyroidism. To boost the immune response, a subgroup of experimental animals with thyrotoxicosis was treated with recombinant interleukin-2. Specific changes of IFN γ /IL-10 ratio depending on thyroid status confirmed a role of opposite cytokine balance for development of different pathological variants. A significant increase in the Th1-marker cytokines revealed at the organ level in cases of thyrotoxicosis argued for direct involvement of thyroid hormones into the immune regulation, as confirmed by a focal infiltration of a thyroid gland with mast cells, along with significant increase in pro-inflammatory cytokines at systemic and organ levels. A hypothesis on possible reception of thyroid hormones by immune cells is in accordance with intensive correlations between the levels of opposite cytokines in target organ and contents of thyroid hormones in peripheral blood. A regulatory role of interleukin-2 was suggested as a factor of keeping balance for opposite cytokines and changing vector of immune response in case of altered thyroid status. The results of our study presume an important role of mast cells and balance of opposite cytokines in pathogenesis of thyroid dysfunction. Further studies are required, in order to clarify the mechanisms of interaction between thyroid hormones and immune cells.

Keywords: thyroid hormones, autoantibodies, opposite's cytokines, mast cell

Введение

Аутоиммунные заболевания щитовидной железы (АИЗЩЖ) занимают лидирующее место в эндокринной патологии, а распространенность их составляет 5 % от численности всего населения планеты [7]. Именно поэтому сохраняется особое внимание к исследованию патогенеза данной группы заболеваний. Помимо поиска доказательств участия цитокинов и хемокинов в патогенезе АИЗЩЖ, внимание исследователей в последние годы привлекают клетки врожденного иммунитета, в том числе мастоциты (МС) [11, 16]. Они образуют специфическое микроокружение для тиреоцитов наряду с симпатическими нервными волокнами, макрофагами и фибробластами [3, 18]. Известно участие МС в регуляции физиологических и патологических реакций Т-клеток при изменении функции фолликулярного эпителия щитовидной железы (ЩЖ) [21]. МС влияют на активацию Т-клеток, опосредуя эту функцию секрецией ряда оппозитных цитокинов. Однако остаются неясными механизмы, посредством которых МС могут стимулировать Т-клетки. Возможно, это происходит через презентацию аутоантигена, но экспрессия МНС (*Major histocompatibility complex*) II класса МС до настоящего времени оспаривается [22]. Предполагается также, что при развитии "nonthyroidal syndrome" МС могут через TLR (*Toll-like receptors*) влиять на секреторную активность тиреоцитов и тем самым запускать синтез оппозитных цитокинов с последующей потерей толерантности к аутоантигенам ЩЖ. Вместе с тем накопленные факты о важной роли МС в патогенезе АИЗЩЖ требуют дальнейшего прояснения.

Целью исследования явилось изучение особенностей реагирования МС и продукции оппозитных цитокинов (IL-1 β , IL-10, IFN γ , TNF α) при изменениях тиреоидного статуса.

Материалы и методы

Эксперимент одобрен этическим комитетом ФГБОУ ВПО ТГМУ Минздрава России (протокол № 3/13, 2013 г.) и выполнен по методике создания экспериментального тиреотоксикоза и гипотиреоза [1] на 6-месячных здоровых крысах-самках Wistar с исходной массой тела 245 \pm 15 г, которые были разделены на четыре группы. В I-й группе (10 голов) моделировали экспериментальный тиреотоксикоз путем введения натошак за час до утреннего кормления с помощью внутрижелудочного зонда натриевой соли левовращающего изомера гормона тироксина ЩЖ (левотироксин натрия в дозе 50 мкг/кг массы тела), растворенного в 1 мл физиологического раствора. II-ая группа (10 голов) получала аналогичным путем левотироксин натрия в той же дозе. С 16 дня эксперимента животным II-й группы дополнительно вводили подкожно рекомбинантный ветеринарный IL-2 («Ронколейкин»), по схеме – 0,1 мл (5000 МЕ) с интервалом 72 часа (всего 5 инъекций в течение 15 дней) с целью моделирования эффектов этого цитокина в условиях тиреотоксикоза. В III-й группе (10 голов) экспериментальный гипотиреоз воспроизводили путем ежедневного введения *per os* растворенного мерказолила (тиамазола) в дозе 10 мг/кг массы тела. IV группа была контрольной (здоровые крысы, 10 голов), находившихся в тех же условиях. Длительность эксперимента для всех групп составила 35 суток. Крысы Wistar были выращены и содержались в аккредитованном vivарии ДВО РАН, где все процедуры с животными проводились в соответствии с международными протоколами экспериментальных работ. В сыворотке крови животных определяли уровень тиреоидных гормонов (ТГ), аутоантител к рецептору тиреотропного гормона (а/т ТТГр) и оппозитных цитокинов (IL-1 β , IFN γ , TNF α , IL-10). Последние определяли также в супернатантах ЩЖ крыс

во всех группах. Для исследования цитокинов использовали видоспецифичные крысиные диагностические наборы R&D Diagnostics Inc., США. Методом твердофазного ИФА определялись показатели сывороточного уровня свободных Т3 и Т4 (св. Т3; св. Т4). Определение содержания а/т ТТГр проводили с использованием тиреоидных стимулирующих моноклональных антител (электрохемилюминисцентный иммунотест ECLIA фирмы Roche diagnostics, Швейцария). Исследовали также морфологические изменения ЩЖ у крыс с различными вариантами тиреоидного статуса. Гистологические препараты окрашивали гематоксилином/эозином, толуидиновым синим (0,1 % раствор при pH 4,9) и азотнокислым серебром (AgNO₃). Материал для трансмиссионной электронной микроскопии фиксировали 2% глицеральдегидом, приготовленным на 0,1 М каодилатном буфере (КБ), pH 7,2 в течение суток при 4 °С, затем промывали в трех порциях КБ и дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации, помещали в ацетон и заливали в смесь эпоксидных смол – Epon и Araldit (Sigma, USA). Срезы материала изготавливали на микротоме Leica EM UC6 (Leica Mikrosystems, Germany). Полутопкие срезы докрашивали 1% раствором метиленового синего, ультратонкие срезы контрастировали 0,5% водным раствором уранил-ацетата и цитратом свинца по Рейнольдсу (1963). Весь гистологический материал анализировали с помощью светового микроскопа Axio Imager (Carl Zeiss, Germany). Ультратонкие срезы исследовали на электронном микроскопе Libra 120 (Carl Zeiss, Germany). Анализ полученных результатов проводился при помощи программы SPSS v.16, выборки проверялись на нормальность распределения при помощи критерия Шапиро–Уилка, применяли U-критерий. Критический уровень значимости был 0,05. При подсчете дегранулирующих МС использовали программу ImageJ и формулу индекса дегрануляции (ИД) = Количество дегранулирующих МС / (неизмененные МС + дегранулирующие МС) × n [2].

Результаты

У животных с экспериментальным тиреотоксикозом и гипотиреозом статистически достоверные отличия уровня а/т к ТТГр от здоровых животных были зафиксированы только в I группе (табл. 1). Наибольшие значения медианы (Me) аутоантител отмечались в группе с гипотиреозом, а наибольшая концентрация ТГ в сыворотке крови животных была во II группе.

Прием животными ТГ *per os* повышал у них сывороточный уровень ряда оппозитных цитокинов – IL-1β, IFNγ, IL-10, а блокада синтеза ТГ с помощью тиамазола и создание гипотиреоидного состояния привели к увеличению концентрации IFNγ и TNFα (табл. 2). Был выявлен достоверный рост уровня IL-1β в сыворотке крови во всех группах по сравнению с контролем. Так, Me концентрации цитокина в I группе была мак-

симальной и превосходила показатели здоровых животных в 8 раз, в III группе – в 3 раза, во II-й группе – в 3,9 раза. Высокие показатели сывороточного IFNγ были определены у животных во всех экспериментальных группах.

Показатели IFNγ коррелировали с сывороточным уровнем а/т к ТТГр ($r = 0,68$; $p < 0,01$) и IL-10 в I группе ($r = 0,55$; $p < 0,01$), а после стимуляции IL-2 во II группе связь цитокинов становилась сильной ($r = 0,83$; $p < 0,01$). Между сывороточными уровнями IFNγ и IL-1β в группах тиреотоксикоза были зафиксированы обратные умеренные связи ($r = -0,50$; $p < 0,05$), которые после введения рекомбинантного IL-2 во II группе значительно усиливались ($r = -0,68$; $p < 0,01$). Аналогичные связи имели место между показателями IFNγ и а/т к ТТГр в III группе ($r = -0,67$; $p < 0,05$).

При тиреотоксикозе в I-й и во II-й группах, отмечено резкое увеличение концентрации сывороточного IL-10 по сравнению с контролем и группой гипотиреоза. Между содержанием св. Т3 и IL-10 выявлена прямая зависимость ($r = 0,52$; $p < 0,05$). Выявлена также сильная прямая связь между уровнем IL-10 и а/т к ТТГр в группе тиреотоксикоза ($r = 0,78$; $p < 0,001$), которая ослабевала после введения IL-2 ($r = 0,63$; $p < 0,05$). В группе гипотиреоза связь между уровнем а/т к ТТГр и IL-10 была средней силы ($r = 0,55$; $p < 0,001$).

Уровень сывороточного TNFα значительно превышал показатели здоровых крыс только в группе с гипотиреозом (табл. 2), а между концентрацией TNFα и уровнем ТГ (св. Т4) выявлена обратная средняя зависимость ($r = -0,57$; $p < 0,001$). В I группе установлена сильная обратная связь ($r = -0,84$; $p < 0,01$) между уровнем а/т ТТГр и показателями TNFα в сыворотке крови. Аналогичная связь, но средней силы имела место между этими показателями в группе гипотиреоза ($r = -0,67$; $p < 0,05$).

Нами зафиксировано достоверное изменение соотношения Th1/Th2-маркерных цитокинов (IFNγ/IL-10) в сыворотке крови экспериментальных животных до 1,2 в группе тиреотоксикоза, 1,9 – в группе с гипотиреозом и 0,77 – в группе тиреотоксикоза на фоне применения рекомбинантного IL-2 против 1,06 – в контроле.

Достоверное снижение organного уровня IL-10 было установлено в I группе – более чем в 3 раза по сравнению с контролем (табл. 2). В этой же группе отмечалось 5-кратное возрастание уровня IFNγ в супернатантах ЩЖ, и фиксировался значительный дисбаланс оппозитных цитокинов IFNγ/IL-10 в ЩЖ (11,35 против 0,66 в группе контроля; $p < 0,01$). Стимуляция крыс с тиреотоксикозом рекомбинантным IL-2 привела к незначительному выравниванию нарушенного соотношения IFNγ/IL-10 (до 5,5 против 11,35 в I-й группе; $p < 0,05$) за счет повышения уровня противовоспалительного IL-10, который возрастал практически до нормальных величин. При этом показатели IFNγ сохранялись значительно повышенными. Наиболее заметные отличия в концентрации оппозитных цитокинов

ТАБЛИЦА 1. СРАВНЕНИЕ ПОКАЗАТЕЛЕЙ ТИРЕОИДНЫХ ГОРМОНОВ И АНТИТЕЛ К ТТГ_р В СЫВОРОТКЕ КРОВИ КРЫС
TABLE 1. THYROID HORMONE INDICES AND AUTOANTIBODIES TO TSHr IN RAT SERUM

Показатель Index	Значения тиреоидных гормонов и аутоантител в группах (Me, Q _{0,25} -Q _{0,75}) Contents of thyroid hormones and autoantibodies in the subgroups (Me, Q _{0,25} -Q _{0,75})			
	Контрольная группа Control group (n = 10)	Группа с гипотиреозом Group with a hypothyroidism (n = 10)	Группы с тиреотоксикозом Group with a thyrotoxicosis (n = 10)	Группа с тиреотоксикозом на фоне ИЛ-2 Group with thyrotoxicosis and IL-2 treatment (n = 10)
св. Т3, пмоль/л Free T3, pmol/L	5,25 (3,60-6,90)	1,98* (1,24-2,09)	8,27* (7,05-9,34)	10,59** (8,24-11,30)
св. Т4, пмоль/л Free T4, pmol/L	15,73 (13,44-18,02)	8,04* (6,21-9,16)	52,43* (39,73-64,60)	62,70* (42,70-68,24)
а/т к ТТГ _р , МЕ/л Auto-antibodies to TSHR IU/L	2,11 (2,26-3,31)	4,31 (3,21-6,10)	4,27* (3,33-7,12)	3,52 (2,80-3,71)

Примечание. * – статистическая значимость различий между показателями экспериментальных животных и контролем ($p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни); ** – $p < 0,01$ по U-критерию.

Note. *, the differences between experimental animals and controls are significant by $p < 0,05$ (Mann–Whitney criterion). **, same, by $p < 0,01$.

в супернатантах ЩЖ были зафиксированы у животных с экспериментальным гипотиреозом. При этом уровни ИЛ-1 β , IFN γ и TNF α в ЩЖ животных III группы отличались от группы контроля в десятки раз, а уровень ИЛ-10 превышал аналогичные показатели в ЩЖ здоровых крыс в 4 раза. Кроме того, зафиксированы отличия от групп животных с тиреотоксикозом: содержание ИЛ-1 β в ЩЖ крыс с гипотиреозом превышало аналогичный показатель при тиреотоксикозе в 55 раз, TNF α – в 10 раз, ИЛ-10 в 5 – 13 раз. Содержание IFN γ при гипотиреозе было максимальным, а Me маркера превышала аналогичный показатель контроля в 9 раз.

Во II и III группах уровень ИЛ-1 β в сыворотке крови был повышен, но, как и в контроле, был значительно ниже, чем в супернатантах ЩЖ (табл. 2). В I-й группе показатели ИЛ-1 β в сыворотке и супернатантах были сравнимыми, а соотношение оппозитных цитокинов ИЛ-10/ИЛ-1 β в супернатантах ЩЖ было нарушено: до 0,43 – в I-й группе и 0,96 – во II группе против величины в 1,45 в контроле. При гипотиреозе это значение снижалось до 0,21. Соотношение оппозитных цитокинов (IFN γ /ИЛ-10) в сыворотке крови в контроле и при тиреотоксикозе было близким к 1, но *in situ* у здоровых животных незначительно преобладали Th2-маркерные цитокины. При тиреотоксикозе это соотношение резко (в 17 раз) повышалось на органном уровне и изменялось в сторону Th1-маркерных цитокинов. Рекомбинантный ИЛ-2 существенно корректировал этот дисбаланс *in situ*, но значительно изменял соотношение оппозитных цитокинов в периферической крови в сторону Th2-маркерных цитокинов. Выявлены также корреляции между уровнем св.Т3 и оппозитными цитокинами в супернатантах ЩЖ. Так, в III группе были зафиксированы сильные обратные связи между св.Т3 и TNF α ($r = -0,981$; $p < 0,01$), между св.Т3 и IFN γ

($r = -0,980$; $p < 0,01$); св.Т3 и ИЛ-1 β ($r = -0,892$; $p < 0,01$); св.Т3 и ИЛ-10 ($r = -0,842$; $p < 0,01$).

При гистологическом исследовании ЩЖ животных с экспериментальным тиреотоксикозом в нескольких случаях зафиксирована мелкоочаговая лимфоидная инфильтрация паренхимы ЩЖ. Пролiferация эпителия наблюдалась преимущественно в виде активного образования микрофолликулов, не содержащих коллоида, сформированных из округлых клеток со светлой цитоплазмой и крупным ядром. У животных, получавших рекомбинантный ИЛ-2, имелись признаки пролиферации эпителия в виде «подушек Сандерсона» (рис. 1, см. 2-ю стр. обложки). Кроме того, в некоторых случаях была выявлена очаговая лимфоидная инфильтрация ЩЖ, без формирования лимфоидных фолликулов и светлых центров.

При экспериментальном гипотиреозе в ЩЖ крыс фиксировалась очаговая пролиферация тиреоидного эпителия, в том числе в виде «подушек Сандерсона», множественные диссоциированные мастоциты (МС), расположенные интерфолликулярно и интрастромально. В подавляющем большинстве ядер клеток фолликулярного эпителия не обнаружено увеличения NOR-областей, что не указывает на усиление пролиферативных свойств А-клеток ЩЖ. Вместе с тем исследование тканей регионарных лимфатических узлов выявило очаги лимфогистиоцитарной пролиферации. При гистологическом исследовании также была установлена очаговая мастоцитарная инфильтрация стромы ЩЖ и окружающей жировой клетчатки с признаками парциальной дегрануляции МС в I-й группе (рис. 3, см. 2-ю стр. обложки). Дегрануляция МС достоверно изменялась после стимуляции ИЛ-2 во II-й группе и была также зафиксирована в III-й экспериментальной группе (табл. 3; рис. 1, 2 – см. 2-ю стр. обложки). ИД рассматривается как важный критерий функциональной активности МС.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ УРОВНЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ И СУПЕРНАТАНТАХ ЩЖ КРЫС ПРИ ТИРЕОТОКСИКОЗЕ И ГИПОТИРЕОЗЕ

TABLE 2. COMPARATIVE DATA ON CYTOKINE LEVELS IN BLOOD SERUM AND THYROID SUPERNATES IN RAT EXPERIMENTS WITH THYROTOXICOSIS AND A HYPOTHYROIDISM

Показатели Indices	Контрольная группа Control group (n = 10)	Значения цитокинов в группах (Me, Q ₂₅ -Q ₇₅) Cytokine values in groups (Me, Q ₂₅ -Q ₇₅)			
		Группа I (тиреотоксикоз) Group with thyrotoxicosis (n = 10)	Группа II (тиреотоксикоз и IL-2) Group with thyrotoxicosis and IL-2 (n = 10)	Группа III (гипотиреоз) Group with hypothyroidism (n = 10)	
Сыворотка крови, пг/мл Blood serum, pg/ml	IL-10	5,62 (2,68-9,24)	16,59 (11,80-28,08)*	34,23 (28,41- 45,19)**	8,40 (2,70-27,20)
	IL-1β	1,90 (0,02-1,98)	15,42 (5,80-38,20)*	3,90 (2,35-42,24)*	4,76 (4,10-4,09)*
	TNFα	0,28 (0,26-1,52)	0,32 (0,28-16,6)	0,29 (0,28-0,85)	13,72 (11,1-36,93)**
	IFNγ	5,96 (4,41-10,06)	19,58 (10,26-68,32)**	26,41 (10,14-47,15)*	16,30 (13,91-23,88)*
Супер- натант, пг/100 мкг белка Supernate, pg/100 mcg protein	IL-10	25,07 (1,94-40,52)	8,19# (5,39-20,48)	20,48# (2,74-35,61)	110,18 (82,39- 165,23)***
	IL-1β	17,31 (16,69-64,24)	19,26# (12,83-42,82)	21,36# (6,21-41,45)	516,08 (450,37- 748,69)***
	TNFα	44,91 (6,10-58,09)	42,58# (11,98-126,45)	50,17# (22,56-121,72)	478,68 (430,63- 591,48)***
	IFNγ	16,40 (14,87-69,21)	92,91# (29,84-133,13)	112,89# (12,51-151,29)	154,92 (106,44- 591,48)*

Примечание. * – статистическая значимость различий между показателями экспериментальных и контрольной групп ($p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни); ** – $p < 0,01$ по U-критерию Манна–Уитни; # – статистическая значимость различий между группами с гипотиреозом и тиреотоксикозом $p < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни.

Note. *, the differences between experimental and control groups are significant by $p < 0.05$ (Mann–Whitney criterion). **, same, $p < 0.01$, by Mann–Whitney criterion. #, statistical significance of distinctions between indices of the experimental animals with hypothyroidism and thyrotoxicosis ($p < 0.05$ by Mann–Whitney criterion).

Если в I-й группе дегранулирующие МС были зафиксированы в строме и перифолликулярном пространстве (рис. 3, 4 – см. 2-ю стр. обложки), то после применения IL-2 их количество достоверно увеличилось в пери- и межфолликулярном пространстве ЩЖ. Об активности тканевых МС во II-й группе свидетельствуют зафиксированные различные варианты дегрануляции – частичный (парциальный) и стандартный, а также диссеминация гранул за пределы цитоплазмы клеток. В III-й группе количество МС и ИД были выше, чем в группе контроля и во II-й группе, но ниже, чем в I-й группе. В группе гипотиреоза фокусы инфильтрации ЩЖ МС преобладали в капсулярной зоне, периваскулярно и интерфолликулярно (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки). В капсулярной и периваскулярной зонах изменялась форма МС на полигональную и овальную, а интерфолликулярные МС были в основном лентовидные и веретеновидные. Количество дегранулирующих МС в паренхиме ЩЖ III-й группы было выше, чем в субкапсулярной и периваскулярной зонах. Единичные интерфолликулярные МС тесно прилежали к клеткам фолликулярного эпителия и дегранулировали среди пролиферирующих тиреоцитов (рис. 2, см. 2-ю стр. обложки). Важно

отметить, что ИД во II группе был выше, чем в группе контроля ($p < 0,05$), но ниже, чем в группе с тиреотоксикозом без дополнительного введения IL-2 ($p_{I-II} < 0,05$) и в группе гипотиреоза ($p_{II-III} < 0,05$), где ИД был максимальным.

Обсуждение

Наиболее высокие уровни св.Т3 и св. Т4 во II группе свидетельствуют о стимулирующем действии IL-2 на синтез ТГ и согласуется с данными об IL-2-подобном действии ТТГ [4]. Достоверно возросший уровень оппозитных цитокинов убедительно доказывает влияние ТГ на функцию иммуноцитов и их участие в иммунорегуляторных процессах. Результаты изменения концентрации IL-1β у животных в зависимости от уровня ТГ позволяют обсуждать его роль в механизмах реагирования на изменения тиреоидного статуса [20]. Кроме того, между сывороточным уровнем IL-1β и IL-10 в I-й группе были выявлены сильные обратные связи ($r = -0,75$; $p < 0,001$), которые изменялись на противоположные – прямые средней силы после дополнительной стимуляции IL-2 животных II группы ($r = 0,69$; $p < 0,001$). Как известно, IL-2 контролирует Th1-/Th2-баланс

и связан с формированием пула Трег-клеток, их активацией, поддержанием их количества и обратной связи между Трег и Т-эффекторными клетками [13]. Подобная динамика корреляций может указывать на то, что, помимо регуляторного действия ТГ и ИЛ-2 на иммунциты, имеют место модулирующие эффекты ИЛ-2 на функцию других цитокинов.

Учитывая, что в экспериментальных моделях были применены препараты, приводящие к разнонаправленным изменениям тиреоидного статуса, можно утверждать, что реакция иммунцитов на любые изменения уровня ТГ проявлялась повышением синтеза ИFN γ и являлась неспецифической. Такой тип реагирования позволяет предположить наличие иммунцитов-посредников, например клеток врожденного иммунитета с неспецифическими реакциями, с последующим производством ИFN γ непосредственно клетками-мишенями (тиреоцитами), что было подтверждено в наших исследованиях высокими показателями данного цитокина в супернатантах ЩЖ животных. ИFN γ , как известно, может усиливать экспрессию МНС-II класса на поверхности АПК, в том числе тиреоцитов и МС, стимулировать процессинг антигенов путем индукции иммунопротеасом, что улучшает презентацию антигена и запускает механизмы адаптивного иммунного ответа [6]. Эти фундаментальные данные согласуются с полученными прямыми средней силы связями между сывороточным уровнем а/т к ТТГр и ИFN γ у крыс с тиреотоксикозом и обратными связями между этими показателями при гипотиреозе, что демонстрирует определяющее значение концентрации ТГ. Полученные в исследовании прямые средней силы связи между уровнем а/т к ТТГр и ИЛ-10 согласуются с данными других авторов о регуляторной функции цитокина непосредственно в ЩЖ [12]. Значительно повышенный уровень сывороточного TNF α при гипотиреозе позволяет отнести данный провоспалительный цитокин к его специфическим маркерам, а также рассматривать TNF α как воз-

можный триггерный фактор аутоиммунного воспаления в ЩЖ. За счет стимуляции синтеза CXCL10 тиреоцитами [6], TNF α может вызывать амплификацию иммунного ответа и инициировать аутоиммунный тиреоидит [7]. В результате эксперимента было также доказано, что достаточно кратковременное изменение уровня ТГ сопровождается дисбалансом в концентрации основных предикторов амплификации иммунного ответа. Зафиксированная динамика может свидетельствовать о ключевой роли ТГ в сохранении баланса Th1-/Th2- и Трег-цитокинов, т. к. сдвиг уровня сывороточных оппозитных цитокинов был ответом на изменение тиреоидного статуса, что не противоречит результатам предшествующих исследований [14].

Сравнение соотношений оппозитных цитокинов в сыворотке крови животных и супернатантах ЩЖ позволяет предположить, что высокая концентрация ИFN γ связана с его «перепроизводством» в ЩЖ, а гиперпродукция ИЛ-10 обусловлена в основном его избыточным синтезом иммунцитами в системном кровотоке. Это подтверждается тем фактом, что во всех экспериментальных группах уровень ИFN γ был умеренно повышен в сыворотке крови и значительно более высоким был его органный уровень. В то же время концентрация ИЛ-10 была достоверно повышена преимущественно в системном кровотоке, за исключением показателей цитокина в супернатантах ЩЖ при гипотиреозе, но в данном случае маркер имел обратные корреляции с уровнем аутоантител. Изменение соотношения ИЛ-10/ИЛ-1 β в системном кровотоке и в ЩЖ, его коррекция с помощью рекомбинантного ИЛ-2 подтверждает гипотезу о важной иммунорегуляторной роли ИЛ-2 и его значения в патогенезе АИЗЩЖ. Сравнительные данные системного и органного уровней ИЛ-1 β не противоречат исследованиям последних лет [20] и расширяют представления о механизмах взаимодействия иммунцитов и ТГ, а сильные корреляции между уровнями ТГ и цитокинов в периферическом кровотоке и в супернатантах

ТАБЛИЦА 3. МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МС В ЩЖ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ
TABLE 3. MORPHOLOGICAL CHARACTERISTICS OF MAST CELLS IN THYROID GLANDS FROM EXPERIMENTAL ANIMALS

Группы животных Groups of animals	Морфофункциональные показатели ЩЖ Morphological characteristics of thyroid glands	
	Количество МС в 1 мм ² Numbers of mast cells per 1 mm ²	Индекс дегрануляции МС Degranulation index of mast cells
Контроль Controls (n = 10)	2,75±0,31	0,31±0,02
I группа I group (n = 10)	12,56±1,20**	0,56±0,03*
II группа II group (n = 10)	5,75±0,21*	0,39±0,011*
III группа III group (n = 10)	7,32±0,27*	0,597±0,02*

Примечание. * – статистическая значимость различий между показателями экспериментальных животных и контролем ($\rho < 0,05$ по U-критерию Манна–Уитни); ** – $\rho < 0,01$ по U-критерию.

Note. *, the differences between experimental animals and controls are significant by $\rho < 0,05$ (Mann–Whitney criterion). **, same, by $\rho < 0,01$.

ЩЖ убедительно доказывают суперантигенные и регуляторные свойства ТГ.

Выявленные при гистологическом исследовании ЩЖ животных тесные контакты МС с фолликулярным эпителием и клетками стромы в фокусах микрофолликулярной пролиферации тиреоцитов приводили, вероятно, к молекулярному выделению секреторного материала МС [5], который реализуется без нарушения целостности плазма-леммы и выброса гранул секрета. Очаговая мастоцитарная инфильтрация стромы ЩЖ и окружающей жировой клетчатки с признаками парциальной дегрануляции МС может свидетельствовать об активизации и важной роли МС в иммунопатогенезе АИЗЩЖ. Роль МС в развитии воспаления в органах-мишенях при аутоиммунных эндокринопатиях подтверждена в недавних исследованиях у пациентов с диабетической нефропатией [23]. Однако до настоящего времени точно неизвестен механизм активации МС и их роль при АИЗЩЖ [11, 16]. Предполагают, что идентификация уровня ТГ мастоцитами может происходить как опосредованно – с помощью лимфоцитов и других иммунцитов [20], так и самостоятельно – с помощью наличия рецепторов к ТГ [22]. Это может подтвердить динамика соотношения оппозитных цитокинов в системном кровотоке и супернатантах ЩЖ, а также гистологические изменения, в том числе на фоне дополнительной стимуляции рекомбинантным IL-2, который в отличие от ТГ поступал не через кишечник, а вводился животным парентерально [19]. Более того, исследование ткани регионарных лимфатических узлов выявило очаги лимфогистиоцитарной пролиферации, но при тиреотоксикозе в ткани лимфатических узлов четких признаков фолликулярной гиперплазии с реактивными центрами обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии стимуляции В-клеточной популяции лимфоцитов, но не исключает активизацию Т-клеточной их популяции [3].

Практически трехкратное возрастание сывроточного уровня IL-10 на введение в организм здорового животного ТГ с дальнейшим увеличением сывроточной концентрации цитокина еще в 2 раза после дополнительной стимуляции рекомбинантным IL-2 согласуется с полученными данными гистохимического исследования ЩЖ – качественному изменению дегрануляции МС. Эти данные подтверждают не только важную регуляторную роль IL-2 при тиреотоксикозе, но и его тесную взаимосвязь с функциональной активностью МС (рис. 3, 4 – см. 2-ю стр. обложки). В ряде исследований [16, 17] обсуждается возможная позитивная роль МС в восстановлении функции ЩЖ с гипотиреозом в эутиреоидное состояние после бактериального NTI («не тиреоидной болезни»). Клетки системы иммунитета, в том числе МС [10], содержат Т3 (трийодтиронин), синтез которого регулируется у них ТТГ, что предполагает непосредственное участие иммунцитов в регулировании тиреоидного статуса.

Наше предположение о важной иммунорегуляторной роли МС при АИЗЩЖ основано на том, что их реакция имела прямую связь с изменением концентрации ТГ у животных с последующим нарастанием системного и органного уровней оппозитных цитокинов, изменением соотношения Th1/Th2-маркерных цитокинов как в сыворотке крови, так и в супернатантах ЩЖ. При тиреотоксикозе значительный дисбаланс содержания IFN γ /IL-10 в ЩЖ выравнялся на фоне введения рекомбинантного IL-2, но при этом изменялся характер дегрануляции МС. Возможно, что МС выполняли в данном случае защитную функцию, так как известно, что эти клетки противодействуют Treg в их дифференцировке в Th17 типа и тем самым способствуют супрессии аутоиммунного воспаления [15]. Один из механизмов, с помощью которого МС влияют на функцию Т-клеток, опосредован секретацией оппозитных цитокинов [8, 9], что может с большей долей вероятности объяснить увеличившийся в 5-6 раз уровень IFN γ в супернатантах ЩЖ животных с тиреотоксикозом (I-я и II-я группы) на фоне мастоцитарной инфильтрации ЩЖ и активной дегрануляции МС.

Заключение

Специфичность изменения соотношения IFN γ /IL-10 в зависимости от тиреоидного статуса может свидетельствовать о значении баланса Th1/Th2-маркерных цитокинов в развитии разных вариантов АИЗЩЖ. Десятикратное увеличение соотношения в сторону Th1-маркерных цитокинов на органном уровне при тиреотоксикозе доказывает непосредственное участие ТГ в иммунорегуляторных процессах путем влияния на этот баланс. Учитывая, что введение ТГ привело к очаговой мастоцитарной инфильтрации ЩЖ на фоне достоверного увеличения провоспалительных цитокинов на системном и органном уровнях, подтверждает участие ТГ в инициации системного воспалительного ответа, возможно, с помощью рецепции их уровня МС и ответного синтеза МС ряда оппозитных цитокинов. Гипотеза о возможной рецепции ТГ клетками иммунной системы доказана наличием интенсивных корреляций между показателями оппозитных цитокинов в ЩЖ и ТГ в периферическом кровотоке. Установлена важная регуляторная роль IL-2 в сохранении баланса оппозитных цитокинов и направлении вектора иммунного ответа при изменениях тиреоидного статуса.

Благодарности

Тихонову Якову Николаевичу (кафедра патологической анатомии ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ) и Елисейкиной Марине Геннадьевне (ФГБУН «Национальный научный центр морской биологии» Дальневосточного отделения РАН).

Список литературы / References

1. Здор В.В., Тихонов Я.Н. Иммунные и гистологические изменения в железах внутренней секреции при экспериментальном тиреотоксикозе и гипотиреозе // Клиническая и экспериментальная тиреологическая, 2014. Т. 10, № 1. С. 55-60. [Zdor V.V., Tikhonov Ya.N. Immune and histological changes in the endocrines glands in experimental thyrotoxicosis and hypothyroidism. *Klinicheskaya i eksperimental'naya tireoidologiya = Clinical and Exeperimental Thyroidology*, 2014, Vol. 10, no. 1, pp. 55-60. (In Russ.)]
2. Микроскопическая техника: Руководство / Под ред. Саркисова Д.С., Перова Ю.Л. М.: Медицина, 1996. 554 с. [Microscopic technique: Manual (Ed. by D.S. Sarkisov, Yu.L. Perova)]. Moscow: Medicine, 1996. 554 p.
3. Хмельницкий О.К. Цитологическая и гистологическая диагностика заболеваний щитовидной железы. СПб.: СОТИС, 2002. 288 с. [Khmelnitskiy O.K. Cytological and histological diagnosis of thyroid diseases]. St. Petersburg: SOTIS, 2002. 288 p.
4. Яглова Н.В., Березов Т.Т. Роль тиреотропного гормона в изменении гормонального и цитокинового профиля при экспериментальном синдроме нетиреоидных заболеваний // Иммунология, 2010. № 3. С. 146-151. [Yaglova N.V., Berezov T.T. The role of thyroid-stimulating hormone in the changing hormonal and cytokine profile in experimental syndrome nonthyroidal diseases. *Immunologiya = Immunology*, 2010, no. 3, pp. 146-151. (In Russ.)]
5. Яглова Н.В., Яглов В.В. Ультраструктурные проявления молекулярного способа выделения секреторного материала тучными клетками щитовидной железы при воздействии липополисахарида // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 155, № 2. С. 260-263. [Yaglova N.V., Yaglov V.V. Ultrastructural characteristics of molecular release of secretory products from thyroid mast cells induced by lipopolysaccharide. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, Vol. 155, no. 2, pp. 260-263. (In Russ.)]
6. Ярилин А.А. Иммунология. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2010. 752 с. [Yarilin A.A. Immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2010. 752 p.
7. Antonelli A., Ferrari S.M., Corrado A., Di Domenicantonio A., Fallahi P. Autoimmune thyroid disorders. *Autoimmun. Rev.*, 2015, Vol. 14, no. 2, pp. 174-180.
8. Benoist C., Mathis D. Mast cells in autoimmune disease. *Nature*, 2002, Vol. 420, pp. 875-878.
9. Brown M.A., Tanzola M.B., Robbie-Ryan M. Mechanisms underlying mast cell influence on EAE disease course. *Mol. Immunol.*, 2002, Vol. 38, pp. 1373-1378.
10. Csaba G., Pallinger E. Thyrotropic hormone (TSH) regulation of triiodothyronine (T(3)) concentration in immune cells. *Inflamm. Res.*, 2009, Vol. 58, no. 3, pp. 151-154.
11. Gregory G.D., Brown M.A. Mast cells in allergy and autoimmunity: implications for adaptive immunity. *Methods in Molecular Biology*, 2006, Vol. 315, pp. 35-50.
12. Kristensen B. Regulatory B and T cell responses in patients with autoimmune thyroid disease and healthy controls. *Dan. Med. J.*, 2016, Vol. 63, no. 2, pii: B5177.
13. Marazuela M., Garcia-Lopez M.A., Figueroa-Vega N., de la Fuente H., Alvarado-Sánchez B., Monsiváis-Urenda A., Sánchez-Madrid F., González-Amaro R. Regulatory T cells in human autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2006, Vol. 91, no. 9, pp. 3639-3646.
14. Nagayama Y., Saiton O., McLachlan S.M., Rapoport B., Kano H., Kumazawa Y. TSH receptor-adenovirus-induced Graves' hyperthyroidism is attenuated in both interferon- γ and interleukin-4 knockout mice; implications for the Th1/Th2 paradigm. *Clin. Exp. Immunol.*, 2004, Vol. 138, no. 3, pp. 417-422.
15. Piconese S., Gri G., Tripodo C. Mast cells counteract regulatory T-cell suppression through interleukin-6 and OX40/OX40L axis toward Th17-cell differentiation. *Blood*, 2009, Vol. 114, no. 13, pp. 2639-2648.
16. Rao K.N., Brown M.A. Mast cells: multifaceted immune cells with diverse roles in health and disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2008, Vol. 1143, pp. 83-104.
17. Rocchi R., Kimura H., Shey-Cherng Tzou, Suzuki K., Rose N.R., Pinchera A., Ladenson P.W., Caturegli P. Toll-like receptor-MyD88 and Fc receptor pathways of mast cells mediate the thyroid dysfunctions observed during nonthyroidal illness. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2007, Vol. 104, no. 14, pp. 6019-6024.
18. Sayed B.A., Christy A., Quirion M.R., Brown M.A. The master switch: the role of mast cells in autoimmunity and tolerance. *Annual Review of Immunology*, 2008, Vol. 26, pp.705-739.
19. Steiner D.R., Gonzalez N.C., Wood J.G. Mast cells mediate the microvascular inflammatory response to systemic hypoxia. *J. Appl. Physiol.* (1985), 2003, Vol. 94, no. 1, pp. 325-334.
20. Sun L., Zhang X., Dai F., Shen J., Ren C., Zuo C., Zhang Q. Elevated interleukin-1 β in peripheral blood mononuclear cells contributes to the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases, especially of Hashimoto thyroiditis. *Endocr. Res.*, 2016, Vol. 41, no. 3, pp. 185-192.
21. Yaglova N.V. Disorders in the secretory cycle of follicular thyrocytes and their correction with thyrotropic hormone in experimental non-thyroidal illness syndrome. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2011, Vol. 152, no. 2, pp. 253-257.
22. Yunzhi Xu, Guangjie Chen. Mast cell and autoimmune diseases. *Mediators Inflamm.*, 2015, Vol. 1, pp. 1-8.
23. Zheng J.M., Yao G.H., Cheng Z., Wang R., Liu Z.H. Pathogenic role of mast cells in the development of diabetic nephropathy: a study of patients at different stages of the disease. *Diabetologia*, 2012, Vol. 55, no. 3, pp. 801-811.

Авторы:

Здор В.В. — к.м.н., научный сотрудник, Центральная научно-исследовательская лаборатория ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

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

Гельцер Б.И. — д.м.н., профессор, член-корр. РАН, Школа биомедицины, директор Департамента фундаментальной и клинической медицины ФГАУ ВО «Дальневосточный федеральный университет»; советник ректора по науке и инновациям ФГБОУ ВО «Тихоокеанский медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Владивосток, Россия

Authors:

Zdor V.V., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

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

Geltser B.I., PhD, MD (Medicine), Professor, Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, School Biomedicine, Director, Department of Fundamental and Clinical Medicine, Far Eastern Federal University; Advisor to the Rector for Science and Innovation, Pacific State Medical University, Vladivostok, Russian Federation

Поступила 20.11.2016

Отправлена на доработку 24.11.2016

Принята к печати 01.12.2016

Received 20.11.2016

Revision received 24.11.2016

Accepted 01.12.2016

ЦИТОКИНОВЫЙ СТАТУС БЕРЕМЕННЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ

Прохоренко Т.С.¹, Зима А.П.^{1,2}, Саприна Т.В.¹, Новицкий В.В.¹,
Тодосенко Н.М.², Литвинова Л.С.²

¹ ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ,
г. Томск, Россия

² ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Резюме. Методом проточной флюориметрии с использованием мультиплексной тест-системы проведено определение концентрации цитокинов (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α) в сыворотке крови беременных в зависимости от вида метаболических нарушений: при гестационном сахарном диабете, ожирении и их сочетании. Изменение цитокинового профиля у беременных с избыточной массой тела или ожирением и беременных с гестационным сахарным диабетом оказалось значительно схожим. У беременных, имеющих избыточный вес или ожирение, выявлено повышение концентрации в крови IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ и TNF α ; у беременных с гестационным сахарным диабетом – повышение содержания в крови IL-2, IL-6, IL-10 и TNF α . При беременности, отягощенной гестационным сахарным диабетом и ожирением, изменения цитокинового профиля носили наиболее выраженный характер. У данных женщин определена повышенная концентрация в крови IL-6, TNF α , GM-CSF и IFN γ на фоне низкого содержания IL-2 и IL-10. Обсуждаются причины и последствия развития у беременных субклинического воспаления. Дается заключение, что у беременных с метаболическими нарушениями субклиническое воспаление развивается с ранних стадий ожирения или нарушения углеводного обмена.

Ключевые слова: цитокины, беременность, ожирение, гестационный сахарный диабет

CYTOKINE PROFILE IN PREGNANT WOMEN WITH METABOLIC DISORDERS

Prokhorenko T.S.^a, Zima A.P.^{a,b}, Saprina T.V.^a, Novitskiy V.V.^a,
Todosenko N.M.^b, Litvinova L.S.^b

^a Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

^b Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Abstract. Serum concentrations of cytokines (IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α) were determined in blood serum of pregnant women with different types of metabolic disorders, i.e., gestational diabetes, obesity, and a combination of those disorders. The study was performed by means of flow fluorimetry, using a multiplex test system. Changes of cytokine profiles in pregnant women with overweight or obesity, and pregnant women with gestational diabetes showed some similarities. In pregnant women with overweight or

Адрес для переписки:

Прохоренко Татьяна Сергеевна
ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
634050, Россия, г. Томск, ул. Московский тракт, 2.
Тел.: 8 (3822) 53-33-09.
E-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Address for correspondence:

Prokhorenko Tatiana S.
Siberian State Medical University
634050, Russian Federation, Tomsk, Moskovsky trakt str., 2.
Phone: 7 (3822) 53-33-09.
E-mail: mmikld.ssmu@gmail.com

Образец цитирования:

Т.С. Прохоренко, А.П. Зима, Т.В. Саприна, В.В. Новицкий, Н.М. Тодосенко, Л.С. Литвинова «Цитокиновый статус беременных с метаболическими нарушениями» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 301-306. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-301-306

© Прохоренко Т.С. и соавт., 2017

For citation:

T.S. Prokhorenko, A.P. Zima, T.V. Saprina, V.V. Novitskiy, N.M. Todosenko, L.S. Litvinova "Cytokine profile in pregnant women with metabolic disorders", *Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 301-306. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-301-306

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-301-306

obesity we have found an increase in blood concentrations of IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ , and TNF α . Meanwhile, an increase in blood levels of IL-2, IL-6, IL-10 and TNF α was revealed in pregnant women with gestational diabetes. The changes in cytokine profile were most pronounced in cases of pregnancy complicated with gestational diabetes and obesity. In these women, increased IL-6, TNF α , GM-CSF and IFN γ concentrations were revealed in blood, along with low contents of IL-2 and IL-10. Potential causes and consequences of suggested subclinical inflammation in pregnant women are discussed. We conclude that pregnant women with metabolic disorders may develop a subclinical inflammation at the early stages of obesity, or metabolic disturbances.

Keywords: cytokines, pregnancy, obesity, gestational diabetes mellitus

Исследование выполнено при финансовой поддержке совета по грантам при Президенте РФ (договор № 14.W01.16.5249-МК).

Введение

К числу наиболее распространенных видов экстрагенитальной патологии у беременных относятся нарушение углеводного обмена и ожирение. Сахарный диабет, как аутоиммунной этиологии (сахарный диабет 1 типа), так и связанный с прогрессирующей инсулинорезистентностью (сахарный диабет 2 типа, гестационный диабет), а также ожирение сопровождаются развитием хронического субклинического воспалительного процесса [2, 3, 5]. Последствия субклинического воспаления у беременных, связанные с угнетением передачи сигналов инсулина клеткам-мишеням, селективным разрушением продуцирующих инсулин бета-клеток, нарушением метаболизма железа, негативно отражаются на здоровье как самой женщины, так и ее будущего ребенка. В связи с этим исследования, направленные на детализацию характера изменения цитокинового статуса как основного показателя выраженности воспалительного процесса, способствуют разработке патогенетически оправданных подходов к оценке прогноза течения беременности, отягощенной метаболическими нарушениями.

Цель исследования — оценка содержания цитокинов в крови беременных в зависимости от вида метаболических нарушений.

Материалы и методы

Проведено обследование 56 беременных с метаболическими нарушениями (избыточной массой тела и ожирением, гестационным сахарным диабетом [ГСД] [Российский национальный консенсус «Гестационный сахарный диабет: диагностика, лечение, послеродовое наблюдение», 2012]), наблюдавшихся у врача-эндокринолога на базе ОГАУЗ «Областной перинатальный центр» г. Томска. По результатам обследования женщины были разделены на три группы: имевшие избыточный вес или ожирение (индекс массы тела более 25 кг/м²), без ГСД — 17 человек; имевшие нормальный индекс массы тела (менее 25 кг/м²), но с ГСД — 19 пациенток; имевшие ГСД и индекс массы тела более 25 кг/м² — 20 беременных.

На момент исследования все пациентки находились на втором триместре беременности. Возраст обследуемых составил от 22 до 40 лет. Группу сравнения составили 14 здоровых женщин сопоставимого группы обследования возраста. Критериями исключения беременных из программы исследования являлись: наличие на момент обследования острых форм и обострения хронических форм инфекционных заболеваний, гнойно-некротических заболеваний, наличие в анамнезе или на момент скрининга аллергических заболеваний (бронхиальная астма, атопический дерматит и т. д.), нефрит любой этиологии, псориаз, а также отказ от участия в исследовании (не подписанное информированное согласие). Исследование соответствовало этическим стандартам и все лица, участвовавшие в исследовании, подписали информированное согласие.

Материалом исследования явилась сыворотка венозной крови, взятая утром до приема пищи из локтевой вены в количестве 10 мл в вакуумную пробирку «BD Vacutainer» с активатором свертывания кремнеземом (Becton Dickinson, США). Методом проточной флюориметрии на двухлучевом лазерном автоматизированном анализаторе (Bio-Plex Protein Assay System, Bio-Rad, США) с использованием мультиплексной тест-системы (Bio-PlexProHuman cytokine 8-Plex panel, Bio-Rad, США) в сыворотке крови определяли концентрацию цитокинов IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, IFN γ , TNF α , согласно инструкции фирмы-производителя набора реагентов. Считывание результатов производилось с помощью автоматического фотометра для микропланшет Bio-Plex (Bio-Plex[®] 200 Systems, Bio-Rad, США) и программы Bio-Plex Manager (Bio-Rad, США). Концентрацию исследуемых цитокинов определяли по стандартной калибровочной кривой.

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью пакета программ SPSS Statistics 18. Проверка нормальности распределения проводилась по критерию Шапиро—Уилка. Пороговый уровень значимости был принят равным 0,05. Полученные данные не подчинялись нормальному закону распределения и были представлены в виде медианы и интерквартильного размаха (Me, Q_{0,25}–Q_{0,75}). В целях установления значимости различий показателей

между независимыми группами сравнения была проведена статистическая обработка с помощью критериев Краскела–Уоллиса с учетом поправки Бонферрони для четырех групп исследования, Манна–Уитни – для двух групп.

Результаты

Анализ данных о концентрации цитокинов в сыворотке крови беременных выявил значительное сходство в изменении изучаемых параметров у женщин, имевших избыточный вес или ожирение, и у обследованных с ГСД. У беременных из этих групп наблюдения содержание в крови ИЛ-2 в 2 раза превышало контрольные цифры. Кроме того, в сравнении со здоровыми женщинами у них определялась повышенная концентрация в сыворотке крови ИЛ-6, ИЛ-10 и TNF α . Для беременных с избыточной массой тела/ожирением оказалось характерным содержание в крови IFN γ , превышавшее таковое у здоровых женщин и беременных с ГСД.

Цитокиновый статус у беременных с сочетанием ГСД и ожирения имел ряд значимых отличий. Подобно результатам обследования беременных других групп наблюдения, у них была выявлена повышенная концентрация в крови ИЛ-6 и TNF α . Однако при беременности, отягощенной ГСД и ожирением, содержание в крови ИЛ-2 оказалось в 2 раза ниже контрольных цифр и в 5 раз ниже его концентрации у беременных, имевших только ГСД или только избыточный вес/ожирение. Концентрация ИЛ-10 у обследованных этой группы также оказалась ниже ее у беременных с ГСД и беременных с избыточным весом или ожирением.

Только у беременных, имевших сочетание ГСД и ожирения, концентрация GM-CSF в крови была выше таковой у здоровых женщин, что дополнялось повышенным (в сравнении с результатами обследования контрольной группы и беременных с ГСД) содержанием в сыворотке крови IFN γ .

Статистически значимых различий в концентрации ИЛ-8 у беременных сравниваемых групп наблюдения не обнаруживалось (табл. 1).

ТАБЛИЦА 1. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ БЕРЕМЕННЫХ С МЕТАБОЛИЧЕСКИМИ НАРУШЕНИЯМИ, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), пг/мл

TABLE 1. SERUM CYTOKINE CONCENTRATIONS IN PREGNANT WOMEN WITH METABOLIC DISTURBANCES, Me (Q_{0,25}-Q_{0,75}), pg/mL

Показатель Parameter	Обследованные лица Subjects under study			
	Здоровые женщины Healthy women (n = 14)	Беременные с избыточной массой тела или ожирением Pregnant women with overweight/obesity (n = 17)	Беременные с гестационным сахарным диабетом Pregnant women with gestational diabetes mellitus (n = 19)	Беременные с гестационным сахарным диабетом и ожирением Pregnant women with gestational diabetes mellitus and obesity (n = 20)
IL-2	2,56 (2,3-2,89)	6,24 (5,01-14,16)*	6,08 (4,32-8,90)*	1,16 (0,72-1,48)* ** ***
IL-6	1,1 (1,09-2,11)	6,12 (4,37-7,77)*	2,9 (2,17-5,43)*	2,26 (2,07-2,34)* **
IL-8	5,27 (4,78-5,56)	8,09 (6,96-9,17)	16,4 (4,64-33,25)	7,79 (3,45-10,23)
IL-10	0,29 (0,24-0,36)	5,21 (3,49-8,11)*	3,65 (0,67-4,34)*	0,54 (0,22-1,80)** ***
GM-CSF	2,11 (1,98-2,12)	1,21 (1,16-2,57)	2,44 (1,21-3,21)	5,45 (4,32-6,67) * ** ***
IFN γ	8,11 (5,63-10,12)	23,22 (13,29-28,12)*	9,51 (7,5-12,11) **	13,27 (10,23-24,22)* ***
TNF α	0,45 (0,36-0,47)	5,12 (2,7-6,86)*	8,88 (6,43-11,2)*	5,54 (3,29-6,45)* ***

Примечание. * – достоверность различий по сравнению с аналогичными показателями здоровых женщин (p < 0,05); ** – беременных с избыточной массой тела или ожирением; *** – беременных с гестационным сахарным диабетом.

Note. *, the differences are significant against similar indexes of healthy women (p < 0.05); **, against pregnant women with overweight or obesity; ***, against pregnant women with gestational diabetes mellitus.

Обсуждение

Одним из связующих звеньев между метаболическими нарушениями при беременности и развитием акушерских осложнений являются цитокины. У беременных с диабетом, избыточной массой тела или ожирением цитокины вырабатываются клетками иммунной системы, жировой тканью, а также плацентой [15, 16, 17], что может усугублять метаболические расстройства и провоцировать развитие воспалительных реакций [1].

В проведенном нами исследовании степень выраженности изменений цитокинового профиля у беременных с избыточной массой тела/ожирением и беременных с ГСД была сопоставимой. Для беременных, имевших избыточный вес или ожирение, повышенные концентрации в крови IL-2, IL-6, IL-10, IFN γ и TNF α можно рассматривать, на наш взгляд, как факторы, усугубляющие инсулинорезистентность. В литературе представлены доказательства способности TNF α ингибировать фосфорилирование рецепторов инсулина и угнетать инсулин-сенситизирующее действие адипонектина [6]. Приводятся доказательства того, что IFN γ может способствовать развитию сахарного диабета 2 типа [18]. Таким образом, у беременных при ожирении формируется самоподдерживающийся воспалительный процесс, ассоциированный с хронической инсулинорезистентностью, способствующий развитию ГСД или сахарного диабета 2 типа.

Выявленное нами повышенное содержание в крови IL-2, IL-6, IL-10 и TNF α при беременности, отягощенной ГСД, можно рассматривать, по нашему мнению, в качестве фактора, снижающего чувствительность тканей к инсулину, усугубляющего инсулинорезистентность и повышающего риск развития сахарного диабета 2 типа после родов. В качестве причин активации продукции цитокинов при ГСД указываются окислительный стресс и активация провоспалительных сигнальных систем вследствие гипергликемии [1].

Негативные последствия диабета и ожирения беременных, связанные с преждевременными родами, появлением манифестного сахарного диабета, заболеваний сердечно-сосудистой системы, эклампсии у женщин, а также макросомии плода, являются предметом широкого обсуждения специалистов [1, 13]. В то же время отдельного упоминания заслуживает вопрос о возможности развития у беременных анемии хронических заболеваний в результате субклинического воспалительного процесса, спровоцированного метаболическими нарушениями. Доказано, что IL-6 является самым сильным активатором продукции в печени и жировой ткани белка острой

фазы гепсидина – связующего звена анемии и иммунного ответа, медиатора развития анемии хронических заболеваний [9]. Как показывают результаты проведенного нами исследования, концентрация IL-6 (наряду с TNF α , IFN γ) в крови у беременных с ГСД, ожирением и их сочетанием превышает таковое у здоровых женщин. Учитывая сложность дифференциальной диагностики анемии хронических заболеваний с железodefицитной анемией (наиболее распространенной анемией у беременных), представляется целесообразным определить беременных с гестационным диабетом и ожирением как группу риска по развитию анемии хронических заболеваний. Проведенное нами исследование косвенно указывает на то, что у данной категории женщин уже к 12-й неделе беременности может формироваться субклиническое воспаление, способное спровоцировать нарушение метаболизма железа.

При беременности, отягощенной ГСД и ожирением, изменения цитокинового профиля, как показывают полученные нами данные, носили более выраженный характер. В первую очередь обращала на себя внимание повышенная концентрация в крови GM-CSF, основная функция которого связана со стимуляцией роста и дифференцировки дендритных клеток, гранулоцитов, эозинофилов и макрофагов, главным образом M1-типа. Совместно с IFN γ он стимулирует продукцию макрофагами провоспалительных цитокинов, в частности IL-6 и TNF α , угнетая при этом продукцию цитокинов Th2-профиля [10, 12]. В результате проведенного исследования мы выявили крайне низкое содержание IL-10 на фоне повышенных концентраций GM-CSF, IFN γ , IL-6 и TNF α в крови беременных с ГСД и ожирением. Схожие результаты были получены и в других исследованиях при обследовании больных с метаболическим синдромом [3], женщин с избыточной массой тела и нарушением толерантности к глюкозе [11] и больных с ожирением [8]. Дополнительно к описанным выше негативным эффектам цитокинов IL-6 и TNF α следует указать на связь повышенного уровня GM-CSF в крови и активации дендритных клеток с патологическим ремоделированием сосудов и высоким риском развития заболеваний сердечно-сосудистой системы у лиц с инсулинорезистентностью и ожирением [14]. Наряду с этим, низкую концентрацию IL-10 в крови у беременных с сочетанными метаболическими нарушениями можно рассматривать и как неблагоприятный фактор, способствующий переходу ГСД в манифестный диабет, поскольку, по данным ряда исследований, IL-10 относится к цитокинам, оказывающим противодиабетическое действие на бета-

клетки островков Лангерганса поджелудочной железы [7, 19]. Установленный по итогам настоящего исследования факт низкого содержания в крови IL-2 у беременных с ГСД и ожирением согласуется с данными исследования по оценке цитокинпродуцирующей способности мононуклеарных клеток периферической крови при метаболическом синдроме, в результате которого авторы также выявили резко сниженную способность вырабатывать IL-2 как в спонтанном, так и в стимулированном варианте клеточных культур [4]. Полученные данные можно трактовать как ослабление пролиферативных реакций иммунной системы, в первую очередь клеточных механизмов, при указанных заболеваниях.

Комплексный анализ цитокинового профиля у беременных с метаболическими нарушениями

подтвердил, что субклиническое воспаление развивается у них с ранних стадий ожирения или нарушения углеводного обмена. С одной стороны, это наблюдение подчеркивает важность своевременной профилактики при беременности, отягощенной нарушением липидного или углеводного обмена, возможных осложнений, ставящих под угрозу здоровье как самой женщины, так и ее будущего ребенка. С другой стороны, знание о наличии воспалительного процесса и его выраженности у беременных с различными метаболическими нарушениями или их сочетанием позволит выделить группы риска по развитию патологических состояний, требующих особо тщательной дифференциальной диагностики (например, анемии хронических заболеваний), и проводить данным женщинам патогенетически обоснованную терапию.

Список литературы / References

1. Аржанова О.Н., Капустин Р.В., Комаров Е.К., Кветной И.М., Полякова В.О. Патогенетические механизмы развития акушерских осложнений при гестационном сахарном диабете // Журнал акушерства и женских болезней, 2011. № 5 С. 3-10. [Arzhanova O.N., Kapustin R.V, Komarov E.K., Kvetnoy I.M., Polyakov V.O. Pathogenic mechanisms of obstetric complications of gestational diabetes. *Zhurnal akusherstva i zhenskikh bolezney = Journal of Obstetrics and Women Diseases*, 2011, no. 5, pp. 3-10. (In Russ.)]
2. Кологривова И.В., Сулова Т.Е., Кошельская О.А., Винницкая И.В., Трубачева О.А. Система матриксных металлопротеиназ и секреция цитокинов при сахарном диабете 2-го типа и нарушении толерантности к углеводам, ассоциированных с артериальной гипертензией // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2013. Т. 156, № 11. С. 578-581. [Kologrivova I.V., Suslova T.E., Koshelskaya O.A., Vinnitskaya I.V., Trubacheva O.A. System of matrix metalloproteinases and cytokine secretion in type 2 diabetes mellitus and impaired carbohydrate tolerance associated with arterial hypertension. *Byulleten eksperimentalnoy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2013, no. 11, pp. 578-581. (In Russ.)]
3. Литвинова Л.С., Кириенкова Е.В., Аксенова Н.Н., Газатова Н.Д., Затолокин П.А. Особенности клеточного иммунитета и цитокинового репертуара у пациентов с метаболическим синдромом // Бюллетень сибирской медицины, 2012, № 3. С. 53-58. [Litvinova L.S., Kirienkova Ye.V., Aksenova N.N., Gazatova N.D., Zatolokin P.A. Features of cellular immunity and cytokine repertoire in patients with metabolic syndrome. *Byulleten sibirskoy meditsiny = Bulletin of Siberian Medicine*, 2012, no. 3, pp. 53-58. (In Russ.)]
4. Литвинова Л.С., Кириенкова Е.В., Газатова Н.Д., Затолокин П.А., Василенко М.А., Аксенова Н.Н., Симбирцев А.С. Особенности цитокинпродуцирующей способности мононуклеарных клеток периферической крови при метаболическом синдроме // Цитокины и воспаление, 2013. Т. 12, № 3. С. 56-60. [Litvinova L.S., Kirienkova E.V., Gazatova N.D., Zatolokin P.A., Vasilenko M.A., Aksenova N.N., Simbirtsev A.S. Features cytokine mononuclear ability of peripheral blood cells of patients with metabolic syndrome. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2013, Vol. 12, no. 3, pp. 56-60. (In Russ.)]
5. Саприна Т.В., Лазаренко Ф.Э., Прохоренко Т.С., Рязанцева Н.В., Ворожцова И.Н. Роль Th1/Th2 дисбаланса иммунного ответа в детерминации клинических особенностей аутоиммунного сахарного диабета взрослых // Сахарный диабет, 2011. № 2. С. 12-17. [Saprina T.V., Lazarenko F.E., Prokhorenko T.S., Ryazantseva N.V., Vorozhtsova I.N. The role of Th1/Th2 immune response imbalance determination in clinical features of autoimmune diabetes adult. *Sakharnyy diabet = Diabetes Mellitus*, 2011, no. 2, pp. 12-17. (In Russ.)]
6. Catalano P.M. Trying to understand gestational diabetes. *Diabet Med.*, 2014, no. 31, pp. 273-281.
7. Chang Y., Piao S.L., Gao S., Zheng D.M. Regulatory effects of micronutrient complex on the expression of Th1 and Th2 cytokines in diabetic C57BL mice. *Wei Sheng Yan Jiu.*, 2005, Vol. 34, no. 1, pp. 64-66.
8. Dicker D., Salook M.A., Marcovicu D., Djaldetti M., Bessler H. Role of peripheral blood mononuclear cells in the predisposition of obese individuals to inflammation and infection. *Obes Facts*, 2013, Vol. 6, no. 2, pp. 146-151.
9. Ganz T. Hcpidin, a key regulator of iron metabolism and mediator of anemia of inflammation. *Blood*, 2003, Vol. 102, no. 3, pp. 783-788.
10. Lacey D.C., Achuthan A., Fleetwood A.J., Dinh H., Roiniotis J., Scholz G.M., Chang M.W., Beckman S.K., Cook A.D., Hamilton J.A. Defining GM-CSF- and macrophage-CSF-dependent macrophage responses by in vitro models. *J. Immunol.*, 2012, Vol. 188, pp. 5752-5765.

11. Lucas R., Parikh S.J., Sridhar S., Guo H., Bhagatwala J., Dong Y., Caldwell R., Mellor A., Caldwell W., Zhu H., Dong Y. Cytokine profiling of young overweight and obese female African American adults with prediabetes. *Cytokine*, 2013, Vol. 64, no. 1, pp. 310-315.
12. Lumeng C.N., Bodzin J.L., Saltiel A.R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, pp. 175-184.
13. Metzger B.E., Gabbe S.G., Persson B., Buchanan T.A., Catalano P.A., Damm P., Dyer A.R., Leiva A., Hod M., Kitzmiller J.L., Lowe L.P., McIntyre H.D., Oats J.J., Omori Y., Schmidt M.I. International Association of Diabetes and Pregnancy Study Groups Recommendations on the Diagnosis and Classification of Hyperglycemia in Pregnancy. *Diabetes Care*, 2010, Vol. 33, no. 3, pp. 676-682.
14. Musilli C., Paccosi S., Pala L., Gerlini G., Ledda F., Mugelli A., Rotella C.M., Parenti A. Characterization of circulating and monocyte-derived dendritic cells in obese and diabetic patients. *Mol. Immunol.*, 2011, no. 49, pp. 234-238.
15. Ramsay J.E., Ferrell W.R., Crawford L., Wallace A.M., Greer I.A., Sattar N. Maternal obesity is associated with dysregulation of metabolic, vascular, and inflammatory pathways. *J. Endocrinol. Metab.*, 2002, Vol. 87, pp. 4231-4237.
16. Retnakaran R., Hanley A.J., Raif N., Connelly P.W., Sermer M., Zinman B. C-reactive protein and gestational diabetes: the central role of maternal obesity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, Vol. 88, pp. 3507-3512.
17. Roberts K.A., Riley S.C., Reynolds R.M., Barr S., Evans M., Statham A., Hor K., Jabbour H.N., Norman J.E., Denison F.C. Placental structure and inflammation in pregnancies associated with obesity. *Placenta*, 2011, Vol. 32, no. 3, pp. 247-254.
18. Tsiavou A., Hatziagelaki E., Chaidaroglou A., Koniavitou K., Degiannis D., Raptis S.A. Correlation between intracellular interferon-gamma (IFN-gamma) production by CD4⁺ and CD8⁺ lymphocytes and IFN-gamma gene polymorphism in patients with type 2 diabetes mellitus and latent autoimmune diabetes of adults (LADA). *Cytokine*, 2005, Vol. 31, pp. 135-141.
19. Xu A., Zhu W., Li T., Li X., Cheng J., Li C., Yi P., Liu L. Interleukin-10 gene transfer into insulin-producing β cells protects against diabetes in non-obese diabetic mice. *Mol. Med. Rep.*, 2015, Vol. 12, no. 3, pp. 3881-3889.

Авторы:

Прохоренко Т.С. — к.м.н., научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Зима А.П. — д.м.н., главный научный сотрудник центральной научно-исследовательской лаборатории, профессор кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск; старший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Саприна Т.В. — д.м.н., доцент, профессор кафедры эндокринологии и диабетологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Новицкий В.В. — д.м.н., профессор, академик РАН, заслуженный деятель науки РФ, заведующий кафедрой патофизиологии ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Томск, Россия

Тодосенко Н.М. — младший научный сотрудник лаборатории иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Литвинова Л.С. — д.м.н., заведующая лабораторией иммунологии и клеточных биотехнологий ФГАОУ ВО «Балтийский федеральный университет имени И. Канта», г. Калининград, Россия

Authors:

Prokhorenko T.S., PhD (Medicine), Research Associate, Central Research Laboratory, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Zima A.P., PhD, MD (Medicine), Main Research Associate, Central Research Laboratory, Professor, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk; Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Saprina T.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Endocrinology and Diabetology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Novitskiy V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pathophysiology, Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

Todosenko N.M., Junior Research Associate, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnologies, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Litvinova L.S., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Immunology and Cell Biotechnology, Immanuel Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation

Поступила 08.12.2016
Принята к печати 13.12.2016

Received 08.12.2016
Accepted 13.12.2016

УРОВЕНЬ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЦИТОКИНОВ И СОСТОЯНИЕ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ У БОЛЬНЫХ ОСТЕОАРТРОЗОМ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИНТЕНСИВНОСТИ БОЛИ

Алексенко Е.Ю., Цвингер С.М.

ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита, Россия

Резюме. Распространенность артериальной гипертензии у больных остеоартрозом достаточно высокая. По данным исследователей, сочетание остеоартроза и артериальной гипертензии регистрируется у 45-80 пациентов в зависимости от возрастных категорий. Патогенетические механизмы формирования и течения артериальной гипертензии у больных остеоартрозом неизменно вызывают интерес у клиницистов. В работе изучены уровни систолического и диастолического артериального давления, содержание некоторых цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α), показатели эндотелиальной функции (EDN1, активность vWF) в зависимости от интенсивности боли у 83 больных (средний возраст 45,7 \pm 6,3 лет) с остеоартрозом коленных и тазобедренных суставов II-III рентгенологической стадии и хроническим болевым синдромом. Выраженность болевого синдрома в течение последнего месяца оценивалась с применением визуальной аналоговой шкалы. По данному показателю пациенты были разделены на три группы. I-ю группу составили 27 пациентов со слабо выраженным болевым синдромом (показатель \leq 3), во II-ю вошли 34 человека с умеренно выраженной суставной болью (3 < показатель < 7), III-я группа состояла из 22 человек, которые оценивали боль как сильную (показатель \geq 7). Установлено, что увеличение интенсивности болевого синдрома влечет за собой возрастание уровней систолического и диастолического артериального давления. Вместе с тем у больных остеоартрозом при умеренном и выраженном болевом синдроме наблюдалось повышенное содержание провоспалительных цитокинов и EDN1 и возрастание активности vWF. Минимальные значения показателей исследуемых в работе цитокинов отмечены у больных со слабо выраженным болевым синдромом, а максимальные – в группе пациентов с сильной болью и артериальной гипертензией. Медиаторы воспаления обладают способностью вызывать активацию и повреждение эндотелия, ведущие к его дисфункции. Активность vWF и содержание EDN1 увеличивались во всех исследуемых группах при нарастании интенсивности боли. Повышение концентрации EDN1, увеличение активности vWF можно расценить как объективные признаки наличия эндотелиоза у больных остеоартрозом. Эндотелиальная дисфункция, в свою очередь, является одним из ведущих патофизиологических механизмов развития артериальной гипертензии. Это может свидетельствовать о вкладе болевого синдрома

Адрес для переписки:

*Алексенко Елена Юрьевна
ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия»
672000, Россия, г. Чита, ул. Горького, 39а.
Тел.: 8 (914) 526-00-98.
Факс: 8 (3022) 32-30-58.
E-mail: e-alexe@mail.ru*

Address for correspondence:

*Aleksenko Elena Yu.
Chita State Medical Academy
672000, Russian Federation, Chita, Gorkogo str., 39a.
Phone: 7 (914) 526-00-98.
Fax: 7 (3022) 32-30-58.
E-mail: e-alexe@mail.ru*

Образец цитирования:

*Е.Ю. Алексенко, С.М. Цвингер «Уровень провоспалительных цитокинов и состояние эндотелиальной функции у больных остеоартрозом в зависимости от интенсивности боли» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 307-312.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-307-312*

© Алексенко Е.Ю., Цвингер С.М., 2017

For citation:

*E. Yu. Aleksenko, S. M. Tsvinger "Proinflammatory cytokine levels and indexes of endothelial function in patients with osteoarthritis is dependent on the pain intensity", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 307-312.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-307-312*

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-307-312

в возникновение и развитие артериальной гипертензии у данной группы больных. Хронический болевой синдром является фактором раннего развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с остеоартрозом.

Ключевые слова: остеоартроз, артериальная гипертензия, цитокины, эндотелиальная дисфункция, болевой синдром

PROINFLAMMATORY CYTOKINE LEVELS AND INDEXES OF ENDOTHELIAL FUNCTION IN PATIENTS WITH OSTEOARTHRITIS IS DEPENDENT ON THE PAIN INTENSITY

Aleksenko E.Yu., Tsvinger S.M.

Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Abstract. Prevalence of hypertension in patients with osteoarthritis is rather high. According to published data, a combination of osteoarthritis and hypertension is registered in 45 to 80% of the patients, dependent on the age group. Pathogenesis of arterial hypertension developing in patients with osteoarthritis is of sufficient interest to the clinicians. We studied systolic and diastolic blood pressure, levels of some cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α) and markers of endothelial function (EDN1, vWF activity) in 83 patients (mean age 45.7 \pm 6.3 years) with osteoarthritis of knee and hip joints (radiographic stage II-III) accompanied by chronic pain. Local pain intensity over last month was evaluated by means of a visual analogue scale. According to the data obtained, the patients were divided into three groups. Group 1 consisted of 27 patients with mild pain (the pain index \leq 3 points), the 2nd group included 34 persons with moderate pain (3 to 7 points), and the 3rd group consisted of 22 people with highest pain ratings (pain index \geq 7). Increased pain intensity correlated with elevation of systolic and diastolic blood pressure. Meanwhile, higher levels of proinflammatory cytokines, and increased activity of EDN1 and vWF were observed in patients with moderate osteoarthritis and severe pain syndrome. Minimal values of cytokines were observed in patients with mild pain, whereas maximal levels, in the patients with severe pain and arterial hypertension. Inflammatory mediators are able to induce activation and injury of endothelium causing its dysfunction. vWF activity and EDN1 contents increased in all the studied groups, along with increased pain intensity. Higher EDN1 concentration and vWF activity may be considered objective signs of endotheliosis in the osteoarthritis patients. In turn, endothelial dysfunction is among major pathophysiological mechanisms of arterial hypertension. This may suggest a sufficient contribution of pain to occurrence and development of arterial hypertension in this group of patients. Chronic pain is likely to be a factor of early development of cardiovascular complications in the patients with osteoarthritis.

Keywords: osteoarthritis, arterial hypertension, cytokines, endothelial function, pain syndrome

Введение

Распространенность артериальной гипертензии (АГ) у больных остеоартрозом (ОА) достаточно высокая. По данным исследователей, сочетание АО и АГ регистрируется у 45-80 пациентов в зависимости от возрастных категорий [7, 9]. Особенности формирования и течения АГ у больных ОА неизменно вызывают интерес у клиницистов. Кроме традиционных факторов риска, специфический вклад в развитие сердечно-сосудистых осложнений у больных ОА могут вносить рецидивирующий болевой синдром, хроническое воспаление, прием нестероидных противовоспалительных препаратов [5, 6]. Доказана позитивная

корреляция между отдельными интерлейкинами (IL-1 и IL-6) и уровнем систолического и диастолического артериального давления (АД) [2, 3]. Медиаторы воспаления обладают способностью вызывать активацию и повреждение эндотелия, ведущие к его дисфункции, что убедительно доказано на примере ревматоидного артрита и анкилозирующего спондилита [8, 4]. Эндотелиальная дисфункция, в свою очередь, является одним из ведущих патофизиологических механизмов развития АГ [10, 11]. Основную роль в развитии дисфункции эндотелия при ОА играют окислительный стресс, продукция мощных вазоконстрикторов (эндотелины, эндопероксиды, АТII),

а также провоспалительных цитокинов, которые подавляют продукцию оксида азота [1, 2]. Эндотелиальная дисфункция со снижением биодоступности эндотелий-зависимого фактора релаксации – оксида азота и увеличением уровня эндотелина, вероятно, вызывает нарушение микроциркуляции при ОА. Патогенетические связи АО и АГ в фокусе взаимоотношения патологии исследованы в настоящее время недостаточно.

Цель работы – изучить содержание некоторых цитокинов, показателей эндотелиальной функции, уровень среднего систолического и диастолического АД у больных ОА в зависимости от выраженности болевого синдрома.

Материалы и методы

В исследование было включено 83 больных с ОА коленных и тазобедренных суставов II-III рентгенологической стадии. Средний возраст больных составил $45,7 \pm 6,3$ лет, среди них мужчин было 37, женщин – 46. У всех пациентов наблюдался болевой синдром. Характеристика его была следующая: боли при движении возникали у 83 пациентов (100%), ночные боли наблюдались у 24 больных (28,9%), стартовые боли испытывали 28 человек (33,7%). Выраженность болевого синдрома в течение последнего месяца оценивалась с применением визуальной аналоговой шкалы (ВАШ, от 0 – отсутствие боли до 10 – максимально выраженная, нестерпимая боль). По данному показателю пациенты были разделены на три группы. I-ю группу составили 27 пациентов со слабо выраженным болевым синдромом (показатель ВАШ ≤ 3), во II-ю вошли 34 человека с умеренно выраженной суставной болью (индекс был более 3, но менее 7), III-я группа состояла из 22 человек, которые оценивали боль как сильную (по ВАШ более 7).

Всем пациентам проводилось определение усредненных показателей систолического, диастолического артериального давления (САД, ДАД) за сутки при мониторинге АД. Средняя длительность мониторинга АД составила $22,1 \pm 1,3$ часа, при этом интервалы измерения АД днем составляли 15 минут, в ночное время (с 23⁰⁰ до 7⁰⁰) – 30 минут. В период проведения СМАД пациенты не были ограничены в физических нагрузках, они продолжали вести обычный образ жизни. За двое суток до и в день проведения исследования пациенты не принимали никаких антигипертензивных препаратов.

Метод определения активности фактора Виллебранда (vWF) основан на его способности вызывать агрегацию тромбоцитов в присутствии антибиотика ристоцетина (ристоминина).

Способность к такой агрегации сохраняется у тромбоцитов после их фиксации формальдегидом, когда полностью утрачивается реакция на другие индукторы агрегации. Изучение проводилось с использованием набора реактивов для определения vWF (НПО РЕНАМ, Россия). Количественное определение эндотелина (EDN1) человека в сыворотке проводилось с использованием иммуноферментного набора компании «БиоХимМак», результаты исследования выражались в фмоль/л. Проводилось изучение следующих цитокинов: IL-1 β , IL-6, TNF α в крови. Для исследования использовались наборы реагентов ЗАО «Вектор-Бест». Результаты исследований определялись в пг/мл.

Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакета статистических программ Statistica 6.1. Перед проведением расчетов все вариационные ряды тестировались на нормальность. Если распределение вариационных рядов не подчинялось критериям нормальности, применялись методы непараметрической статистики. Для описания характера распределения количественных признаков определялись средние величины (M), стандартное отклонение (SD). При использовании методов непараметрической статистики определялись медиана, межквартильный интервал (от 25 до 75%). Достоверность различий оценивалась с использованием t-критерия Стьюдента и с помощью U-критерия Манна-Уитни при ненормальном распределении. Различия считались достоверными при $p < 0,05$. Наряду с этим был проведен корреляционный анализ с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена и статистики тау Кендалла.

Результаты и обсуждение

При изучении исследуемых параметров у больных с ОА выявлены однонаправленные изменения. Полученные данные представлены в таблице 1. Увеличение интенсивности болевого синдрома влекло за собой возрастание уровней САД и ДАД, при этом достоверная разница получена между I и III группами. Хронический болевой синдром является фактором раннего развития осложнений сердечно-сосудистых заболеваний у пациентов с ОА [6]. При детальном анализе показателей суточного мониторинга АД, анамнеза жизни, данных амбулаторных карт у всех пациентов III-й группы имелась сопутствующая артериальная гипертензия ранее существовавшая или впервые диагностированная. В I группу вошли два больных с сопутствующей артериальной гипертензией I степени, во II-й группе таковых было трое.

ТАБЛИЦА 1. СОДЕРЖАНИЕ НЕКОТОРЫХ ЦИТОКИНОВ, ПОКАЗАТЕЛЕЙ ЭНДОТЕЛИАЛЬНОЙ ФУНКЦИИ, УРОВЕНЬ СРЕДНЕГО САД И ДАД У БОЛЬНЫХ ОА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВЫРАЖЕННОСТИ БОЛЕВОГО СИНДРОМА
TABLE 1. CONTENTS OF SOME CYTOKINES, ENDOTHELIAL DYSFUNCTION INDEXES, MEAN SYSTOLIC (SAD) AND DIASTOLIC (DAD) ARTERIAL PRESSURE IN OSTEOARTHRITIS PATIENTS DEPENDENT ON SEVERITY OF PAIN SYNDROME

Показатель Index	I группа Group I (n = 27)	II группа Group II (n = 34)	III группа Group III (n = 22)	Уровень статистической значимости Statistical significance level
САД, мм рт. ст. Systolic AD, mm Hg	116,2±8.2	126,3±7,7	146,4±12,7	$p_{1-3} < 0,00001$
ДАД, мм рт. ст. Diastolic AD, Mm Hg	74,5±7,2	86,8±6,8	91,8±12,7	$p_{1-3} < 0,0001$
EDN1, fmol/mL	5,8 [2,4-11,6]	11,6 [7,5-12,8]	12,8 [6-15,8]	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$
vWF, %	82 [67-117]	114 [89-161]	119 [87-129]	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$
IL-1 β , pg/mL	18,7 [13,1-20,1]	21,1 [15,9-25]	25,1 [21,5-74,2]	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
IL-6, pg/mL	11,7 [11,2-14,1]	18,2 [11,9-21,8]	19,7 [15-24]	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$
TNF α , pg/mL	9,7 [8,8-10,8]	11,7 [7,6-13,8]	13,4 [10,6-15,6]	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} < 0,05$

По активности vWF и содержанию эндотелина-1 обнаружены различия между I и II, III группами. При этом группы с умеренно выраженным и сильным болевым синдромом не отличались друг от друга. Повышение концентрации EDN1, увеличение активности vWF при усилении болевого синдрома можно расценить как объективные признаки наличия эндотелиоза у больных ОА.

Показатели исследуемых в работе всех цитокинов возрастали от I до III группы. Минимальные значения их отмечены у больных со слабо выраженным болевым синдромом, а максимальные – в группе пациентов с сильной болью и артериальной гипертензией. Статистически

значимые различия установлены по уровням IL-1 β , IL-6, TNF α между всеми группами больных. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α) у пациентов с ОА в связи с нарастанием болевого синдрома может свидетельствовать о выраженности воспалительного компонента в патогенезе заболевания. Максимальные значения IL-1 β , IL-6, TNF α продемонстрировала группа больных ОА с выраженным болевым синдромом в сочетании с АГ. Наличие хронического воспаления, вероятно, является одним из патогенетических факторов возникновения и формирования АГ у данной группы больных.

Учитывая, что провоспалительные цитокины могут изменять функцию эндотелия сосудов, увеличение их концентрации в крови больных ОА может являться одной из причин развития и прогрессирования АГ у этой группы пациентов. В исследовании установлена связь между наличием у больных ОА и отдельными показателями эндотелиальной дисфункции: активностью vWF (Спирмена $R = 0,609$), содержанием EDN1 (Спирмена $R = 0,193$). При прогрессировании ОА и увеличении длительности болезни статистически значимо усиливаются проявления дисфункции эндотелия. Следует отметить, что в третьей группе пациентов не представляется возможным оценить роль каждого из исследуемых факторов,

поскольку имеет место коморбидность и взаимотягущающее влияние хронического воспалительного и болевого синдромов при ОА и артериальной гипертензии.

Таким образом, в исследовании у больных с ОА при умеренном и выраженном болевом синдроме выявлено повышение концентрации провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-18, TNF α) и признаки наличия эндотелиоза (нарастание концентрации EDN1, усиление активности vWF). Это может свидетельствовать о вкладе болевого синдрома в возникновение и развитие артериальной гипертензии у данной группы больных. Связь ОА и АГ обусловлена общими патогенетическими механизмами хронического воспаления и боли.

Список литературы / References

1. Алексенко Е.Ю., Говорин А.В., Цвингер С.М. Нитроксидпродуцирующая функция эндотелия и агрегационная способность тромбоцитов у больных первичным остеоартрозом // Бюллетень Восточно-Сибирского научного центра СО РАМН, 2011. № 1. С. 21. [Aleksenko E.Yu., Govorin A.V., Tsvinger S.M. Nitroxideproductive function of endothelial cells and aggregative ability of thrombocytes in patients with primary osteoarthritis. *Byulleten` Vostochno-Sibirskogo nauchnogo tsentra SO RAMN = Bulletin of the East Siberian Scientific Center SBRAMS, 2011, no. 1, p. 21.* (In Russ.)]
2. Алексенко Е.Ю., Говорин А.В. Оценка маркеров воспаления и показатели оксидативного стресса у больных остеоартрозом в сочетании с артериальной гипертензией // Сибирский медицинский журнал (Томск), 2011. Т. 26, № 1. С. 54-58. [Alexenko E.Yu., Govorin A.V. Assessment of markers of inflammation and oxidative stress indices in patients with arterial hypertension associated with osteoarthritis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Tomsk) = The Siberian Medical Journal (Tomsk), 2011, Vol. 26, no. 1, pp. 54-58.* (In Russ.)]
3. Анкудинов А.С., Калягин А.Н. Иммуномодулирующие цитокины при хронической сердечной недостаточности, ассоциированной с остеоартрозом коленных суставов // Сибирский медицинский журнал (Иркутск), 2015. № 5. С. 43-46. [Ankudinov A.S., Kalyagin A.N. Immunomodulatory cytokines in chronic heart failure associated with knee osteoarthritis. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal (Irkutsk) = The Siberian Medical Journal (Irkutsk), 2015, no. 5, pp. 43-46.* (In Russ.)]
4. Линева О.Г., Попкова Т.В., Новикова Д.С., Насонов Е.Л. Ингибиторы ФНО- α и их влияние на факторы риска поражения сердечно-сосудистой системы у пациентов с ревматоидным артритом // Научно-практическая ревматология, 2010. Т. 48, № 1. С. 31-36. [Lineva O.G., Popkova T.V., Novikova D.S., Nasonov E.L. Tumor necrosis factor- α inhibitors and their effects on cardiovascular risk factors in patients with rheumatoid arthritis. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice, 2010, Vol. 48, no. 1, pp. 31-36.* (In Russ.)]
5. Мартынов А.И., Наумов А.В., Верткин А.Л. Ведение больных остеоартритом с коморбидностью в общей врачебной практике: мнение экспертов, основанное на доказательной медицине // Лечащий врач, 2015. № 4. С. 344-349. [Martinov A.I., Naumov A.V., Vertkin A.L. Observation of the patients with osteoarthritis with comorbidity in general medical practice: expert opinions based on evidentiary medicine. *Lechashchiy vrach = Attending Doctor, 2015, no. 4, pp. 344-349.* (In Russ.)]
6. Мендель О.И., Наумов А.В., Верткин А.Л. Остеоартроз как фактор риска сердечно-сосудистых катастроф // Украинский ревматологический журнал, 2010. Т. 3, № 41. С. 13-16. [Mendel O.I., Naumov A.V., Vertkin A.L. Osteoarthritis as a factor of risk of cardiovascular accidents. *Ukrainskiy revmatologicheskii zhurnal = Ukrainian Rheumatology Journal, 2010, Vol. 3, no. 4, pp. 13-16.* (In Russ.)]
7. Насонов Е.Л., Попкова Т.В. Кардиоваскулярные проблемы в ревматологии // Научно-практическая ревматология, 2004. № 4. С. 4-9. [Nasonov E.L., Popkova T.V. Cardiovascular problems of rheumatology. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice, 2004, no. 4, pp. 4-9.* (In Russ.)]
8. Попкова Т.В., Новикова Д.С., Насонов Е.Л. Сердечно-сосудистые заболевания при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология, 2016. Т. 54, № 2. С. 46-49. [Popkova T.V., Novikova D.S.,

Nasonov E.L. Cardiovascular diseases in rheumatoid arthritis: latest data. *Nauchno-prakticheskaya revmatologiya = Rheumatology Science and Practice*, 2016, Vol. 54, no. 2, pp. 46-49. (In Russ.)]

9. Griffin T.M., Guilac F. The role of mechanical loading in the onset and progression of osteoarthritis. *Exerc. Sport. Sci. Rev.*, 2005, Vol. 33, no. 4, pp. 195-200.

10. Nüesch E., Dieppe P., Reichenbach S. All cause and disease specific mortality in patients with knee or hip osteoarthritis: population based cohort study. *BMJ*, 2011, Vol. 342, pp. 11-65.

11. Ong K.L., Wu B.J., Cheung B.M. Arthritis: its prevalence, risk factors, and association with cardiovascular diseases in the United States, 1999 to 2008. *Ann. Epidemiol.*, 2013, Vol. 23, pp. 80-86.

Авторы:

Алексенко Е.Ю. — д.м.н., доцент, заведующая кафедрой поликлинической терапии с курсом медицинской реабилитации, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита, Россия

Цвингер С.М. — к.м.н., ассистент кафедры поликлинической терапии с курсом медицинской реабилитации, ФГБОУ ВО «Читинская государственная медицинская академия», г. Чита, Россия

Authors:

Aleksenko E. Yu., PhD, MD (Medicine), Head, Department of Polyclinical Therapy with a Course of Medical Rehabilitation, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Tsvinger S.M., PhD (Medicine), Assistant Professor, Department of Polyclinical Therapy with a Course of Medical Rehabilitation, Chita State Medical Academy, Chita, Russian Federation

Поступила 19.10.2016
Отправлена на доработку 20.10.2016
Принята к печати 26.12.2016

Received 19.10.2016
Revision received 20.10.2016
Accepted 26.12.2016

ОСОБЕННОСТИ ЦИТОКИНОВОГО СПЕКТРА У БОЛЬНЫХ НЕАЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ В СОЧЕТАНИИ С СОПУТСТВУЮЩИМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

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

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

Резюме. Нами обследовано: 31 практически здоровый человек и 35 больных неаллергической БА (НАБА), 22 больных НАБА в сочетании с сахарным диабетом 2 типа (СД2), 23 больных СД2. Определение концентрации IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ проводилось методом ИФА по стандартным протоколам с помощью коммерческих наборов («Вектор-Бест» и «Цитокин», Россия).

В обследованной популяции больных с сочетанием БА и СД2Т бронхиальная астма была представлена неаллергическим вариантом, что, по-видимому, согласуется с высказанным ранее предположением об особенностях инсулин-рецепторных взаимодействий при бронхиальной астме.

В группе больных с сочетанием БА и СД2Т было выявлено значимое нарастание уровней IL-6, IFN γ и снижение IL-4 по сравнению с контролем и НАБА; также выявлено нарастание уровней IL-4, IL-6, IFN γ по сравнению с СД2. Выявленные нами клинико-патогенетические особенности у больных БА в сочетании с СД2 могут указывать на существование дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов у этих больных, который может приводить к прогрессированию нарушения углеводного обмена, с повышением гликирования и нарастанием изменений в бронхолегочной системе.

Ключевые слова: бронхиальная астма, сахарный диабет 2 типа цитокины, IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ , TNF α

CYTOKINE PROFILE FEATURES IN THE PATIENTS WITH NON-ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA WITH CO-EXISTING TYPE 2 DIABETES MELLITUS

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

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

Abstract. Thirty-five patients with non-allergic bronchial asthma (NABA), 22 patients with NABA and diabetes mellitus type 2 (DT2), 23 subjects with DT2, and 31 healthy controls were enrolled into the study. ELISA assays for IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ were performed by means of a standardized protocol using immunoassay kits purchased from VectorBest, and Cytokine.

In asthma patients complicated by DT2, the pattern of bronchial asthma was ascribed to NABA. This finding may be consistent with a theory of specific insulin-receptor interactions in asthma. The NABA patients with type 2 diabetes mellitus exhibited a significant increase in IL-6, IFN γ , and decrease of IL-4, as compared

Адрес для переписки:

*Минеев Валерий Николаевич
ГБОУ ВПО «Первый Санкт-Петербургский
государственный медицинский университет
им. акад. И.П. Павлова» Министерства
здравоохранения РФ
198516, Россия, Санкт-Петербург, Петропавловск,
Санкт-Петербургский пр., 56/15.
Тел.: 8 (812)-450-71-63.
E-mail: minvn@spmu.rssi.ru*

Address for correspondence:

*Mineev Valery N.
First St. Petersburg I. Pavlov State Medical University
198516, Russian Federation, St. Petersburg, Petrodvorets,
Sankt-Peterburgsky ave, 56, apt 15.
Phone: 7 (812) 450-71-63.
E-mail: minvn@spmu.rssi.ru*

Образец цитирования:

Л.Н. Сорокина, В.А. Иванов, В.Н. Минеев, В.В. Лим, В.И. Трофимов «Особенности цитокинового спектра у больных неаллергической бронхиальной астмой в сочетании с сопутствующим сахарным диабетом 2 типа» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 3. С. 313-318. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-313-318

© Сорокина Л.Н. и соавт., 2017

For citation:

L.N. Sorokina, V.A. Ivanov, V.V. Lim, V.N. Mineev, V.I. Trofimov "Cytokine profile features in the patients with non-allergic bronchial asthma with co-existing type 2 diabetes mellitus", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 3, pp. 313-318. doi: 10.15789/1563-0625-2017-3-313-318

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-3-313-318

with healthy controls and NABA. Moreover, we have revealed an increase of IL-4, IL-6, IFN γ , when compared with DT2.

Hence, the patients with coexistence of non-allergic bronchial asthma and DT2 were characterized by a specific cytokine profile of pro- and anti-inflammatory cytokines, which may correlate with increased glycation and deterioration of lung function.

Keywords: bronchial asthma, diabetes type 2, cytokines, IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ , TNF α

Введение

Изучение сочетания бронхиальной астмы (БА) и сахарного диабета 2 типа (СД2) представляется наиболее актуальным (как в клиническом, так и в фундаментальном научном аспекте) для понимания механизмов патогенеза этих двух заболеваний, их клинико-патогенетических особенностей и возможного взаимовлияния. Вероятно, развивающийся цитокиновый дисбаланс при сочетании этих двух распространенных заболеваний может нарастать или модифицироваться со временем и способствовать прогрессированию метаболических изменений у этих больных.

Что касается цитокинового профиля, то ключевыми в развитии иммунологических сдвигов при сочетании бронхиальной астмы и сахарного диабета 2 типа являются, по-видимому, провоспалительные (IL-6, IFN γ) и противовоспалительные цитокины (IL-4, IL-10).

В данной статье предпринята попытка исследования уровней цитокинов плазмы периферической крови у пациентов с бронхиальной астмой в сочетании с сахарным диабетом 2 типа в сравнении с практически здоровыми лицами контрольной группы и больными неаллергической бронхиальной астмой и сахарным диабетом 2 типа в отдельности.

Материалы и методы

Нами обследовано: 31 практически здоровый человек и 35 больных НАБА, 22 больных неаллергической БА (НАБА) в сочетании с СД2, 23 больных СД2. Все обследованные больные БА находились на лечении в клинике госпитальной терапии им. акад. М.В. Чернуцкого Первого Санкт-Петербургского государственного медицинского университета имени академика И.П. Павлова.

Всем больным проводили комплексное клинико-лабораторное обследование, а также аллергологическое и гормональное исследования в частности, с определением уровня гликированного гемоглобина, глюкозы крови, инсулина, С-пептида, а также, исследованием функции внешнего дыхания.

Диагноз БА устанавливали в соответствии с классификацией и критериями международного консенсуса по вопросам диагностики и лечения БА (Global Initiative of Asthma – GINA, 2016). Диагноз СД2 установлен эндокринологом в соответствии со стандартами [1].

Определение концентрации IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ проводилось методом иммуноферментного анализа по стандартным протоколам проведения оценки уровней цитокинов с помощью коммерческих наборов («Вектор-Бест» и «Цитокин»,

Россия) на спектрофотометре StatFax® 303Plus с длиной волны 450 нм с построением калибровочной кривой «от точки к точке».

Методы статистической обработки

Статистическую обработку результатов исследований проводили с помощью стандартного пакета прикладного статистического анализа SPSS для Windows (русифицированная версия 21.0). Различия считались значимыми при $p < 0,05$. Для сравнения более двух групп использован критерий Н независимых выборок Краскела–Уоллиса. В случае, когда распределение нельзя считать нормальным (по критерию Колмогорова–Смирнова $p < 0,05$), используется непараметрическая статистика: Медиана ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$). Если распределение является нормальным (по критерию Колмогорова–Смирнова $p > 0,05$), используется параметрическая статистика: $M \pm \sigma$. Для сравнения двух несвязанных выборок непараметрической статистики используется U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни.

Результаты и обсуждение

Нами проведена сравнительная оценка уровней цитокинов IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ у практически здоровых лиц и пациентов с неаллергической бронхиальной астмой, пациентов с сочетанием с сахарного диабета 2 типа, у пациентов с сахарным диабетом 2 типа (результаты представлены в таблице 1).

Как видно из таблицы 1, больные НАБА в сочетании с СД2 характеризуются в целом цитокиновым спектром, отличающимся от других обследованных групп, преимущественно по уровням цитокинов IL-4, IL-6 и IFN γ .

При анализе отдельно по группам уровней экспрессии цитокина IL-4 наиболее высокие концентрации IL-4 отмечаются у больных НАБА. Отметим, что при НАБА, НАБА в сочетании с СД2, значимых различий в уровнях IL-4 по степеням тяжести течения и в зависимости от фазы бронхиальной астмы не отмечается. Больные, страдающие НАБА в сочетании с СД2, напротив, характеризовались существенным снижением уровня IL-4, как по сравнению с контрольной группой, так и по сравнению с группами больных БА (НАБА). У больных с изолированным СД2 уровни IL-4 оказались наименьшими.

Нами был проведен анализ уровней IL-4 в зависимости от концентрации глюкозы плазмы крови натощак. В группе пациентов, имеющих уровни глюкозы в плазме крови более 6,1 ммоль/л, отмечался значительно более низкий уровень IL-4 (0,5 (0,0001;1,0) Медиана ($Q_{0,25}$ – $Q_{0,75}$), чем в группе с уровнем глюкозы 6,1 и менее (2,33 (1,27; 4,32).

ТАБЛИЦА 1. УРОВНИ ЦИТОКИНОВ IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ У ПРАКТИЧЕСКИ ЗДОРОВЫХ ЛИЦ И ПАЦИЕНТОВ С НЕАЛЛЕРГИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ, ПАЦИЕНТОВ С СОЧЕТАНИЕМ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА, У ПАЦИЕНТОВ С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ 2 ТИПА

TABLE 1. LEVELS OF IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ CYTOKINES IN HEALTHY CONTROLS AND PATIENTS WITH NON-ALLERGIC BRONCHIAL ASTHMA (NABA), SUBJECTS WITH TYPE 2 DIABETES MELLITUS (T2DM), AND PATIENTS WITH NABA/T2DM COMORBIDITY

Обследованные группы Studied groups	Контроль Control (1)	НАБА NABA (2)	СД2 DM 2 type (3)	НАБА+СД2 NABA+DM 2 (4)	Достоверность различий* Significance of differences*
Уровень IL-4 IL-4 levels	0,95 (0,63; 1,3)**	2,44 (1,27; 4,32)	0,1 (0; 0,6)	0,55 (0,3; 1,0)	$p_{1-4} = 0,001$
Уровень IL-6 IL-6 levels	6,75 (3,21; 11,65)	11,5 (4,54; 33,0)	11,56 \pm 7,58***	20,3 \pm 15,48***	$p_{1-4} = 0,01$
Уровень IL-10 IL-10 levels	9,09 (3,30; 12,88)	0,01 (0,01; 0,01)	7,0 (0,01; 11,5)	10,5 (3,25; 18,0)	$p_{1-4} = 0,001$
Уровень IFN γ IFN γ levels	4,07 (2,78; 5,9)	5,75 (2,99; 10,73)	0,5 (0,0001; 6,5)	18,5 (1,5; 77,0)	$p_{1-4} = 0,001$

Примечание. * – критерий Н Краскела–Уоллиса; ** – Медиана ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$); *** – М среднее \pm σ .

Note. * – Kruskal–Wallis H-test; ** – M ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$); *** – Mean \pm σ .

ТАБЛИЦА 2. УРОВНИ IL-4 (ПГ/МЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ГЛЮКОЗЫ ПЛАЗМЫ НАТОЩАК У ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ

TABLE 2. IL-4 LEVELS IN BLOOD SERUM, DEPENDING ON PLASMA GLUCOSE LEVELS IN THE PATIENTS STUDIED

Обследованные группы в зависимости от уровня глюкозы Studied groups, dependent on glucose level	Значение уровня IL-4 IL-4 levels (pg/mL)	Достоверность различий Significance for the differences observed
Глюкоза Glucose < 6,1 (1) n = 59	2,33 (1,27; 4,32)*	$p_{1-2} < 0,001^{**}$
Глюкоза Glucose \geq 6,1 (2) n = 54	0,5 (0,0001; 1,0)*	

Примечание. * – Медиана ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$); ** – U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни; *** – критерий Краскела–Уоллиса.

Note. * – M ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$); ** – Wilcoxon–Mann–Whitney U-test; *** – Kruskal–Wallis H-test.

Изучение уровней IL-4 в зависимости от степени гликирования (в зависимости от уровней гликированного гемоглобина) представлено в таблице 2.

Нами был проведен анализ уровней IL-4 в зависимости от концентрации глюкозы плазмы крови натощак и степени гликирования (в зависимости от уровней гликированного гемоглобина) (табл. 2, 3).

Функционирование провоспалительных цитокинов, таких как TNF α и IL-1 β , координирует, как предполагается, IL-6, показана его роль в развитии СД2 [17, 20].

Нами при исследовании уровней IL-6 было обнаружено (табл. 1) повышение уровня данного цитокина по сравнению с контрольной группой во всех обследованных группах больных, при этом наиболее высокие концентрации IL-6 выявлены у больных НАБА в сочетании с СД2. Следует отметить, что при НАБА, НАБА в сочетании

с СД2 значимых различий в уровнях IL-6 в зависимости от фазы бронхиальной астмы не отмечается. При НАБА выявлено существенное отличие уровня IL-6 при тяжелой НАБА, в сравнении с легким и течением средней тяжести ($p = 0,004$, критерий Краскела–Уоллиса).

Ранее было показано, что пациенты с плохим гликемическим контролем в сравнении с пациентами с адекватным гликемическим контролем характеризовались более низкими значениями ОФВ1 и ФЖЕЛ, а также повышением таких маркеров воспаления, как TNF α , С-реактивный протеин, ферритин и фибриноген [8].

При сравнительном анализе уровней цитокина IL-10 по группам (табл. 1) можно обратить внимание, что уровень этого цитокина при НАБА достоверно ниже, чем в контрольной группе (практически здоровых лиц), и является минимальным среди всех обследованных групп.

ТАБЛИЦА 3. УРОВНИ IL-4 (ПГ/МЛ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ) В ЗАВИСИМОСТИ ОТ УРОВНЯ ГЛИКИРОВАННОГО ГЕМОГЛОБИНА (HbA1C) ПЛАЗМЫ У ОБСЛЕДОВАННЫХ БОЛЬНЫХ (ГРУПП СД2, НАБА В СОЧЕТАНИИ С СД2, НАБА В СОЧЕТАНИИ С НТГ)

TABLE 3. DEPENDENCE BETWEEN IL-4 CONCENTRATIONS IN BLOOD SERUM AND PLASMA LEVELS OF GLYCATED HEMOGLOBIN (HbA1C) IN THE EXAMINED PATIENTS GROUPS

Обследованные группы в зависимости от уровня HbA1C Studied groups depending on HbA1C levels	Значение уровня IL-4* Serum IL-4* levels, pg/mL	Достоверность различий Significance of the differences observed
HbA1C < 6,0 n = 13 (1)	0,95 (0,7; 1,75)	p = 0,018*** p ₁₋₂ = 0,155** p ₁₋₃ = 0,938** p ₁₋₄ = 0,005** p ₁₋₅ = 0,014** p ₂₋₃ = 0,287** p ₂₋₄ = 0,001** p ₂₋₅ = 0,002** p ₃₋₄ = 0,014** p ₃₋₅ = 0,042** p ₄₋₅ = 0,661**
HbA1C 6,0-6,49 n = 14 (2)	1,9 (0,6; 3,25)	
HbA1C 6,5-6,99 n = 7 (3)	1,0 (0,5; 2,0)	
HbA1C 7,0-8,99 n = 10 (4)	0,45 (0,08; 0,63)	
HbA1C ≥ 9,0 n = 9 (5)	0,12 (0,0001; 0,6)*	

Примечание. * – распределение нельзя считать нормальным (по критерию Колмогорова–Смирнова $p < 0,05$), поэтому используется непараметрическая статистика: Медиана ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$); ** – значимость различий определяется с применением критерия непараметрической статистики U-критерий Вилкоксона–Манна–Уитни для сравнения двух несвязанных выборок. *** – для сравнения более двух независимых выборок использован критерий Краскела–Уоллиса для попарного сравнения между собой более двух групп.

Note. *, nonparametric statistics was used, since Kolmogorov–Smirnov test showed $p < 0.05$: nonparametrics, M ($Q_{0,25}-Q_{0,75}$); **, Wilcoxon–Mann–Whitney U-test was used for the two independent groups; ***, Kruskal–Wallis H-test was used for more than two groups.

Что касается больных с СД2, то уровни IL-10 сопоставимы с таковыми в контрольной группе.

У больных НАБА при сочетании с СД2 отмечается значимое повышение уровня IFN γ в плазме крови по сравнению с контрольной группой, с изолированной НАБА и изолированным СД2 (табл. 1), что может быть связано с потенцированием роли данного цитокина как провоспалительного при сочетании этих двух заболеваний. У больных СД2 выявлен минимальный уровень IFN γ в плазме крови, значимо отличающийся от такового в контрольной группе и в группах больных изолированной НАБА, НАБА в сочетании с СД2, что согласуется с данными литературы [5].

Обсуждение

Нами проведено исследование уровней цитокинов IL-4, IL-10, IL-6, IFN γ в плазме периферической крови и определен цитокиновый профиль при НАБА по сравнению с группой практически здоровых лиц, а также при СД2 и у больных НАБА в сочетании с СД2. Следует отметить, что в обследованной популяции больных с сочетанием БА и СД2Т бронхиальная астма была представлена неаллергическим вариантом, что, по-видимому, согласуется с высказанным ранее предположением об особенностях инсулин-рецепторных взаимодействий при бронхиальной астме [2, 3].

Представляется крайне важным выявленное нами значимое снижение концентрации IL-4 у больных НАБА+СД2 и СД2 в сравнении с НАБА. Как хорошо известно, при БА имеет место сдвиг дифференцировки наивных Т-хелперов в сторону Т-хелперов 2 типа [10]. Цитокины, синтезируемые Th2-лимфоцитами, такие как IL-4, IL-5, IL-9

и IL-13, выполняют основную работу в регуляции атопических явлений, иммунном ответе, опосредованном IgE, и других процессах взаимодействия элементов воспалительного [6, 7].

Учитывая, что при СД2 концентрация IL-4 минимальна, можно предполагать, что при СД2, как изолированном, так и в сочетании с БА роль IL-4 снижается. Это согласуется с данными литературы. Так, в частности, Freund G. и соавт. при исследовании модели сахарного диабета 2-го типа в культуре человеческих моноцитов было показано нарушение сигнализации IL-4 [14]. В этой связи представляет интерес наличие выявленной нами отрицательной корреляционной связи между уровнем IL-4 и уровнем инсулина в группе больных сахарным диабетом 2 типа ($r = -0,473$; $p = 0,048$; $n = 18$), что, по-видимому, может указывать на связь нарушений IL-4-сигнализации с развитием механизмов инсулинрезистентности.

Одним из решающих патогенетических аспектов является развитие внутри клетки механизмов резистентности к инсулину. Поскольку IL-4 относится к тем цитокинам, сигнализация которых обеспечивается теми же общими сигнальными путями, что и инсулиновый рецептор, то развитие резистентности к инсулину, как показали исследования Freund G.G. и соавт. может приводить и к цитокиновой резистентности [14]. Они показали, что при СД2 нарушается сигнализация IL-4 через IRS-2.

Закономерным является и выявленное нами различие в уровнях IL-4 в зависимости от концентрации глюкозы (у больных с повышенной концентрацией глюкозы $\geq 6,1$ ммоль/л уровни

IL-4 были значимо ниже, чем у пациентов с нормальной концентрацией глюкозы плазмы натощак и степени гликирования (чем выше степень гликирования, т. е. уровень HbA1C, тем ниже уровень IL-4). Данный факт представляется крайне интересным, учитывая наличие закономерной прямой связи между уровнем глюкозы крови и выраженностью процессов гликирования в организме. Повышение гликирования белков имеет, как предполагают, ключевое значение в нарушении регуляции иммунной системы и развитии осложнений при СД2.

Обнаруженное нами повышение уровней IL-6 во всех обследованных группах больных, максимальное у больных НАБА в сочетании с СД2, представляется вполне логичным, учитывая как регулируемую, так и индуцирующую роль данного цитокина в процессах иммунного воспаления. При этом вполне закономерно, что уровень провоспалительного цитокина IL-6 (секретируемого как Th2-клетками и макрофагами, так и эпителиальными клетками бронхолегочной системы) повышается у больных бронхиальной астмой по сравнению с практически здоровыми лицами [9, 13]. Кроме того, ранее установлено нарастание уровня IL-6 как в жидкости БАЛ и сыворотке крови, так и в эпителиальных клетках легких от больных БА [11, 12, 19].

С другой стороны, известно, что повышение IL-6 и TNF α (а также С-реактивного белка), которое имеет место при ожирении, может индуцировать развитие инсулинорезистентности, с последующим повышением уровня инсулина [15, 16], который, как «ростовой фактор», может оказывать прямое воздействие на бронхолегочную систему, повышая массу ГМК и их сократительную способность, с последующим развитием ремоделирования за счет стимуляции ГМК бронхов к продукции коллагена. Это может приводить к ухудшению функциональных показателей легких [9, 17], особенно при сочетании БА и СД2.

Существенное повышение уровня IFN γ в плазме крови больных НАБА при сочетании с СД2 по сравнению с контрольной группой, с изолированной НАБА и изолированным СД2 может быть связано с потенцированием роли данного цитокина как провоспалительного при

сочетании этих двух заболеваний. В то же время минимальный уровень IFN γ у больных СД2 согласуется с данными литературы и является маркерным для СД2 [5], что определяет, в частности, низкую устойчивость больных этой группы к инфекциям (в частности, к туберкулезу) и другим инфекционным осложнениям [18].

Заключение

В заключение следует отметить, что выявленные нами клинико-патогенетические особенности у больных бронхиальной астмой в сочетании с сахарным диабетом 2 типа, вероятно, могут указывать на существование дисбаланса про- и противовоспалительных цитокинов у этих больных, который может приводить к прогрессированию нарушения углеводного обмена, с повышением гликирования и нарастанием изменений в бронхолегочной системе, что создает платформу для выяснения особенностей экспрессии транскрипционных факторов и негативных регуляторов транскрипции генов в будущем.

Постепенно развивающийся цитокиновый дисбаланс в той или иной степени присутствует как при бронхиальной астме, так и при сахарном диабете 2 типа и может прогрессировать во времени и способствовать нарастанию метаболических нарушений. Описываемый непрерывный и развивающийся во времени процесс взаимосвязи и взаимозависимости иммунных и метаболических нарушений может быть охарактеризован как иммунно-метаболический континуум, который может рассматриваться как в научных, так и в практических целях, наряду с другими континуумами, такими как сердечно-сосудистый, кардиоренальный, кардиопульмональный [4].

Полученные нами данные позволяют рассматривать сложность нарушений цитокиновой сигнализации, возникающих при сочетании этих двух заболеваний (БА и СД2), в неразрывной связи с прогрессирующими метаболическими изменениями на различных уровнях (на клиническом, организменном, органном и уровне иммунно-клеточной регуляции), с позиций плеiotропности и полифункциональности молекул исследованных цитокинов в рамках иммунно-метаболического континуума.

Список литературы / References

1. Дедов И.И., Шестакова М.В. Алгоритмы специализированной медицинской помощи больным сахарным диабетом. Клинические рекомендации (7-й выпуск) // Проблемы эндокринологии, 2015. Т. 18, № 1. С. 1-112. [Dedov I.I., Shestakova M.V. Algorithms of a specialized medical care for patients with diabetes mellitus. Clinical recommendations (7th release). *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology*, 2015, Vol. 18, no. 1, pp. 1-112. (In Russ.)]
2. Колычев А.П., Минеев В.Н., Булатова Н.Ю., Федосеев Г.Б. Особенности инсулин-рецепторных взаимодействий при бронхиальной астме // Пульмонология, 1994. № 2. С. 48-51. [Kolychev A.P., Mineev V.N., Bulatova N.Yu., Fedoseev G.B. The features of insulin – receptor interactions in bronchial asthma. *Pulmonologiya = Pulmonology*, 1994, no. 2, pp. 48-51. (In Russ.)]
3. Минеев В.Н. Концепция бронхиальной астмы как мембрано-рецепторной патологии // Иммунопатология, аллергология, инфектология, 2005. № 3. С. 68-85. [Mineev V.N. The concept of bronchial asthma as a membrane-receptor pathology *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya = Immunopathology, Allergology, Infectology*, 2005, no. 3, pp. 68-85. (In Russ.)]
4. Минеев В.Н. Континуумы в клинической медицине // Медицинский академический журнал, 2016. Т. 16, № 3. С. 19-28. [Mineev V.N. The continuums in clinical medicine. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal*, 2016, Vol. 16, no. 3, pp. 19-28. (In Russ.)]
5. Azenabor A., Ogbera A.O., Okafor Ch.J., Adejuwon N. Interplay of T helper 1 and 2 cytokines in type 2 diabetes mellitus with and without microvascular complications. *Int. J. Biol. Med. Res.*, 2011, Vol. 2, no. 4, pp. 917-921.
6. Andrews A.L., Holloway J.W., Holgate S.T., Davies D.E. IL-4 receptor alpha is an important modulator of IL-4 and IL-13 receptor binding: implications for the development of therapeutic targets. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, pp. 7456-7461.

7. Barnes P.J. The cytokine network in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *J. Clin. Invest.*, 2008, Vol. 118, no. 11, pp. 3546-3556.
8. Dennis R.J., Maldonado D., Rojas M.X., Aschner P., Rondon M., Charry L., Casas A. Inadequate glucose control in type 2 diabetes is associated with impaired lung function and systemic inflammation: a cross-sectional study. *BMC Pulm. Med.*, 2010, Vol. 10, no. 1, pp. 38.
9. Kamimura D., Ishihara K., Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. of Physic., Biochem. and Pharmac.*, 2003, Vol. 149, pp. 1-38.
10. Kelly-Welch A.E. Interleukin-4 and interleukin-13 signaling connections maps. *Science*, 2003, Vol. 300, no. 5625, pp. 1527-1528.
11. Kicic A., Sutanto E.N., Stevens P.T., Knight D.A., Stick S.M. Intrinsic biochemical and functional differences in bronchial epithelial cells of children with asthma. *Am. J. of Resp. and Critic. Care Med.*, 2006, Vol. 174, no. 10, pp. 1110-1118.
12. Marini M., Vittori E., Hollemborg J., Mattoli S. Expression of the potent inflammatory cytokines, granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor and interleukin-6 and interleukin-8, in bronchial epithelial cells of patients with asthma. *J. of Allergy and Alinic. Immunol.*, 1992, Vol. 89, no. 5, pp. 1001-1009.
13. Neveu W.A., Allard J.L., Raymond. D.M., Bourassa L.M., Burns S.M., Bunn J.Y., Irvin Ch.G., Kaminsky D.A., Rincon M. Elevation of IL-6 in the allergic asthmatic airway is independent of inflammation but associates with loss of central airway function. *Resp. Res.*, 2010, Vol. 11, no. 1, p. 28.
14. O'Connor J.C., Sherry C.L., Guest C.B., Freund G.G. Type 2 diabetes impairs insulin receptor substrate-2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase activity in primary macrophages to induce a state of cytokine resistance to IL-4 in association with over expression of suppressor of cytokine signaling-3. *J. of Immunol.*, 2007, Vol. 177, no. 11, pp. 6886-6893.
15. Pickup J.C., Mattock M.B., Chusney G.D., Burt D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. *Diabetologia*, 1997, Vol. 40, no. 11, pp. 1286-1292.
16. Pradhan A.D., Manson J.E., Rifai N., Buring J.E., Ridker P.M. C-reactive protein, interleukin 6, and risk of developing type 2 diabetes mellitus. *JAMA*, 2001, Vol. 286, no. 3, pp. 327-334.
17. Singh S., Prakash Y.S., Linneberg A., Agrawal A. Insulin and the lung: connecting asthma and metabolic syndrome. *J. of Allergy*, 2013, Vol. 2013, pp. 1-8.
18. Stalenhoef J.E., Alisjahbana B., Nelwan E.J., Ven-Jongekrijg J., Ottenhoff T.H.M., Meer J.W.M., Nelwan R.H., Netea M.G., Crevel R. The role of interferon-gamma in the increased tuberculosis risk in type 2 diabetes mellitus. *Eur. J. of Clin. Microbiol. and Infect. Dis.*, 2007, Vol. 27, no. 2, pp. 97-103.
19. Stankiewicz W., Dabrowski M.P., Chcialowski A., Plusa T. Cellular and cytokine immunoregulation in patients with chronic obstructive pulmonary disease and bronchial asthma. *Mediators of Inflamm.*, 2002, Vol. 11, no. 5, pp. 307-312.
20. Trayhurn P., Beattie J.H. Physiological role of adipose tissue: white adipose tissue as an endocrine and secretory organ. *Proc. Nutr. Soc.*, 2001, Vol. 60, no. 3, pp. 329-339.

Авторы:

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

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

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

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

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

Authors:

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

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

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

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

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

Поступила 06.12.2016

Отправлена на доработку 13.12.2016

Принята к печати 29.12.2016

Received 06.12.2016

Revision received 13.12.2016

Accepted 29.12.2016

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 оплаты 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, ttf, 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

Алексенко Е.Ю.....	307	Минеев В.Н.	313
Барбараш О.Л.	241	Михайлова В.А.	285
Беликова М.Е.	285	Новицкий В.В.	301
Белякова К.Л.	285	Окорокова Л.С.	285
Галимова Э.С.	267	Останин А.А.	255
Гельцер Б.И.	293	Понасенко А.В.	241
Демина Д.В.	225	Прохоренко Т.С.	301
Жидкова И.И.	241	Саприна Т.В.	301
Зацаренко С.В.	275	Сельков С.А.	285
Здор В.В.	293	Сизиков А.Э.	255
Зима А.П.	301	Соколов Д.И.	285
Иванов В.А.	313	Сорокина Л.Н.	313
Кинго К.	267	Тихонова М.А.	255
Козлов В.А.	225	Тодосенко Н.М.	301
Кокс С.	267	Трофимов В.И.	313
Кузьмина Е.Г.	275	Тыринова Т.В.	255
Курочкина Ю.Д.	255	Худинян М.М.	285
Кутихин А.Г.	241	Хуторная М.В.	241
Леплина О.Ю.	255	Цвингер С.М.	307
Лим В.В.	313	Черных Е.Р.	255
Литвинова Л.С.	301	Чумасова О.А.	255
Маркелова Е.В.	293	Шиленкова Ю.В.	285

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аллельные варианты.....	241	многофакторный анализ.....	276
аллергические заболевания	276	ожирение	301
алло-СКЛ.....	255	оппозитные цитокины	293
ангиогенез	285	остеоартроз.....	308
артериальная гипертензия	308	плацента	285
ассоциация	267	полиморфизм генов	241
атеросклероз.....	241	преэклампсия	285
аутоантитела	293	псориаз	267
беременность.....	301	ревматоидный артрит.....	255
болевого синдром	308	рецепторы врожденного иммунитета.....	241
бронхиальная астма.....	313	сахарный диабет 2 типа цитокины	313
воспаление.....	241	тиреоидные гормоны	293
врожденный иммунитет.....	267	триптофан.....	225
вторичные иммунодефицитные состояния	276	трофобласт.....	285
генетика	267	цитокины.....	255, 285, 301, 308
гестационный сахарный диабет.....	301	эндотелиальная дисфункция	308
дексаметазон	255	эндотелий	285
дендритные клетки.....	255	IFN α	255
иммунитет	276	IFN γ	313
иммунный ответ	241	IL-10.....	313
иммунопатология.....	225	IL-4	313
иммуносупрессия.....	225	IL-6	313
кинурины	225	indoleamine 2,3-dioxygenase.....	225
мастоциты.....	293	TLR7	267
метод главных компонент.....	276	TLRs.....	241
миссенс-мутация Gln11Leu	267	TNF α	313

ИЛЛЮСТРАЦИИ К СТАТЬЕ «ВЛИЯНИЕ ФАКТОРОВ, СЕКРЕТИРУЕМЫХ ПЛАЦЕНТОЙ, НА ФОРМИРОВАНИЕ СОСУДОПОДОБНЫХ СТРУКТУР ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ В ПРИСУТСТВИИ КЛЕТОК ТРОФОБЛАСТА» (АВТОРЫ: СОКОЛОВ Д.И., БЕЛЯКОВА К.Л., МИХАЙЛОВА В.А., ШИЛЕНКОВА Ю.В., ХУДИНЯН М.М., ОКороКОВА Л.С., БЕЛИКОВА М.Е., СЕЛКОВ С.А. [с. 285-292])

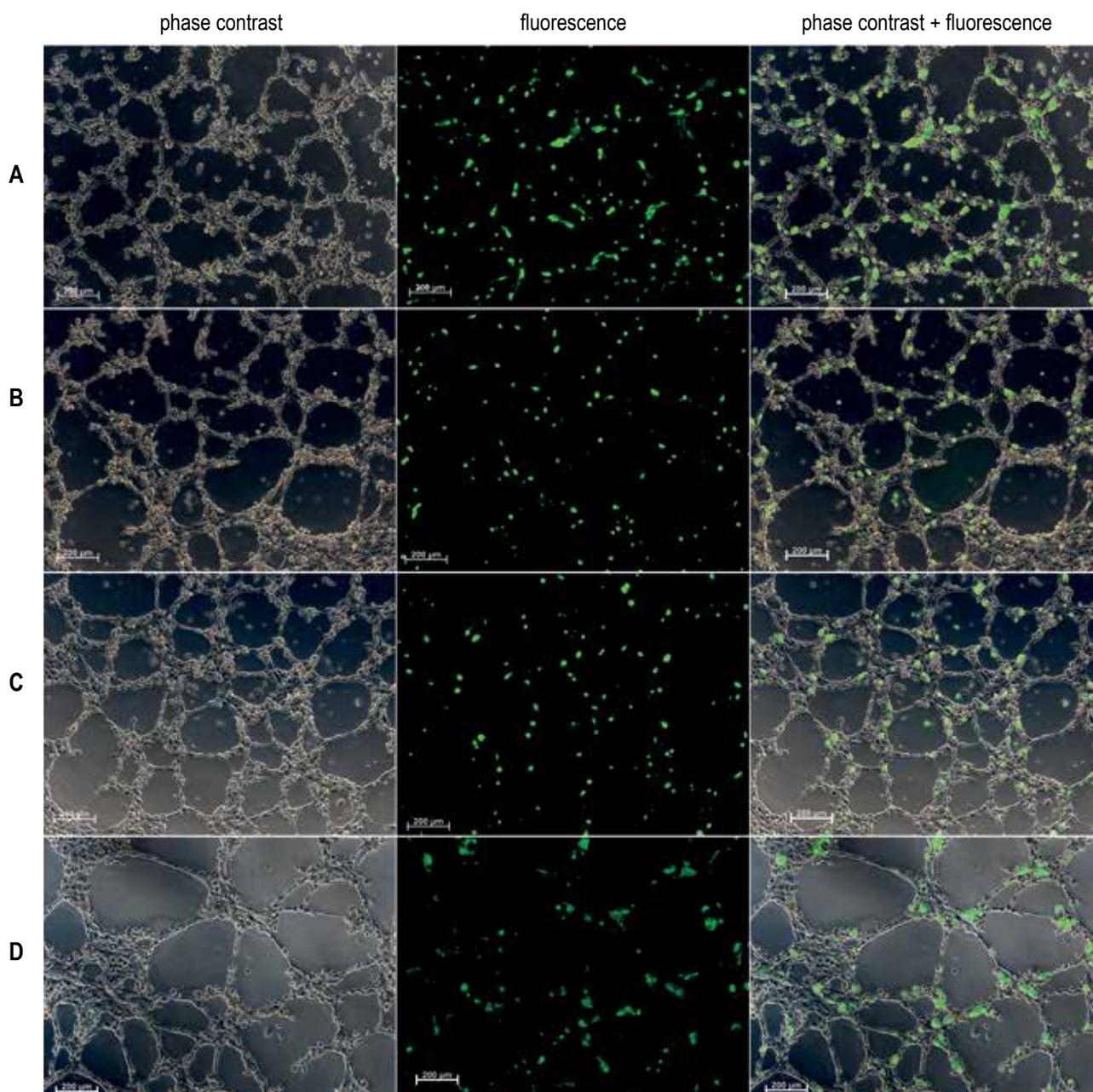
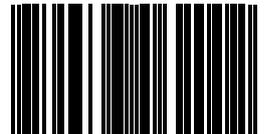


Figure 1. Tube-like structures formed by EC cell line EA.Hy926 (unstained) in the presence trophoblast cell line Jeg-3 (stained with green fluorescent vital dye CalceinAM)

Note. (A) the spontaneous level; (B) in the presence of conditioned media of placentas from women with healthy pregnancy on 9-11 weeks of gestation; (C) in the presence of conditioned media of placentas from women with healthy pregnancy on 38-39 weeks of gestation; (D) in the presence of conditioned media of placentas from women with pregnancy complicated with preeclampsia on 38-39 weeks of gestation.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

ISSN 1563-0625



9 771563 062002 >