

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

Том 19, № 4. С. 323-482

2017

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

KEDRION

BIOPHARMA

Keep Life Flowing

И.Г.Вена

ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНЫЙ
РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ

ВЫСОКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ВСЕМ НУЖНЫ



www.kedrion.com

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

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

июль-август

2017, том 19

№ 4

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

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

Редакционная коллегия

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

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

Кетлинский Сергей Александрович – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, главный научный сотрудник Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

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

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

Корнева Елена Андреевна – доктор медицинских наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАН, главный научный сотрудник отдела общей патологии и патологической физиологии НИИ экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Мазуров Вадим Иванович – доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, президент Северо-Западного государственного медицинского университета имени И.И. Мечникова Минздрава России, заведующий кафедрой терапии и ревматологии имени Э.Э. Эйхвальда, Санкт-Петербург, Россия

Назаров Петр Григорьевич – доктор медицинских наук, профессор, руководитель отдела иммунологии Института экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, Россия

Ответственный секретарь:

Ракитянская Н.В.

E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Редактор перевода:

д.м.н. Чухловин А.Б.

Редакция: тел./факс (812) 233-08-58

Адрес для корреспонденции:

197136, Санкт-Петербург, а/я 58.

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

© Медицинская иммунология

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

Свидетельство о регистрации № П 3612.

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

Свидетельство о регистрации ПИ № 77-15892.

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

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

Издательство «Человек»

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

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Подписано в печать 17.08.2017 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.

Усл. печ. л. 20. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.) Заказ № 1172

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, заместитель директора по научной работе Государственного НИИ особо чистых биопрепаратов ФМБА России, Санкт-Петербург, Россия

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

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

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

Редакционный совет

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

July-August

2017, volume 19

No. 4

Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS 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 Allergy, 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, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

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

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

Elena A. Korneva – PhD, MD, Professor, RAS full member, Institute of Experimental Medicine, Department of Pathology and Pathophysiology, Chief researcher, St. Petersburg, Russian Federation

Vadim I. Mazurov – PhD, MD, Professor, RAS full member, Nord-Western State Medical University, President, Department of Therapy and Rheumatology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Petr G. Nazarov – PhD, MD, Professor, Institute of Experimental Medicine, Department of Immunology, Chief, St. Petersburg, Russian Federation

Sergei A. Nedospasov – PhD, Professor, RAS full member, Lomonosov State University, Department of Immunology, chief; Institute of Physico-Chemical Biology, Belozersky, Department of Molecular Immunology, Chief, Moscow, Russian Federation

Managing Editor:

Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:

Alexey B. Chukhlov, PhD, MD

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58

Address for correspondence:

197136, St. Petersburg, P.O. Box 58.

Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western

Regional Administration for the Press Affairs

of the Russian Federation, March 26, 1999.

Certificate of registration PI № 77-15892

by the Ministry of Press, Television,

Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.

Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)

Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

Chelovek Publishing House

199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyye pers. Vasilevsky Island, 26, office 2.

E-mail: mail@mirmed.ru

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

Passed for printing 17.08.2017. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.

Printed sheets 20. 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, Deputy-director on Science, 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

Черенова Л.В., Каштиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М.

РАЗРАБОТКА ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ: ОБЗОР ЗАРУБЕЖНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ЧАСТЬ 2)..... 329

Сенников С.В., Куликова Е.В., Кнауэр Н.Ю., Хантакова Ю.Н.

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПОСРЕДУЕМЫЕ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ 359

Оригинальные статьи

Лосев И.В., Доница С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Ерофеева М.К., Стукова М.А., Руденко Л.Г., Найхин А.Н.

ИНДУКЦИЯ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ Т- И В-КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К ВИРУСУ ГРИППА А (H5N1) У ЛЮДЕЙ, ПРИВИТЫХ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ А(H5N2) 375

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

ИНДУКЦИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С НА ФОНЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ..... 387

Табакоев Д.В., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Панчук И.О., Короткова О.В., Кадагидзе З.Г.

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ НК- И НКТ-ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ..... 401

Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Петричук С.В., Закиров Р.Ш., Курбатова О.В., Копыльцова Е.А., Комах Ю.А.

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК И Т-ХЕЛПЕРОВ 17 В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА..... 409

Тыринова Т.В., Леплина О.Ю., Мишинов С.В., Тихонова М.А., Калиновский А.В., Чернов С.В., Ступак В.В., Останин А.А., Черных Е.Р.

УЧАСТИЕ ПЕРФОРИН/ГРАНЗИМ Б-ЗАВИСИМОГО МЕХАНИЗМА В РЕАЛИЗАЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА..... 421

Ганковская Л.В., Намазова-Баранова Л.С., Хорева М.В., Брагвадзе Б.Г., Огурцова А.Д., Алексеева А.А., Ганковский В.А., Свитич О.А.

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 И TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ..... 431

Давыдова Е.В., Зурочка А.В.

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО АДАМАНТАНА В ТЕРАПИИ АСТЕНИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА..... 441

Смоляникова М.В., Смирнова С.В., Ильенкова Н.А., Коноплева О.С.

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕКОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ 453

Точка зрения

Шуленина Е.А., Абакушина Е.В., Лысюк Е.Ю.

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НК-КЛЕТОК И NKG2D-ПОЗИТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ КРОНА..... 461

Материалы XVI Всероссийского научного Форума с международным участием имени академика В.И. Иоффе «Дни Иммунологии в Санкт-Петербурге» 5-8 июня 2017 г. (тезисы, не вошедшие в Специальный выпуск журнала «Медицинская иммунология», 2017, т. 19)..... 471

Юбилей 474

Дневник иммунолога..... 476

Правила для авторов 479

Авторский указатель 482

Предметный указатель 482

CONTENTS

Reviews

Cherenova L.V., Kashtigo T.V., Saiadian Kh.S., Shmarov M.M.

DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON ADENOVIRAL VECTORS: A REVIEW OF FOREIGN CLINICAL STUDIES (PART 2).....	329
---	-----

Sennikov S.V., Kulikova E.V., Knauer N.Yu., Khantakova Yu.N.

MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS MEDIATED BY DENDRITIC CELLS INVOLVED IN THE INDUCTION OF TOLERANCE.....	359
---	-----

Original articles

Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Erofeeva M.K., Stukova M.A., Rudenko L.G., Naykhin A.N.

INDUCTION OF LONG-TERM T AND B CELL MEMORY IMMUNITY TO INFLUENZA A VIRUS (H5N1) IN PERSONS VACCINATED WITH LIVE INFLUENZA A VACCINE (H5N2)	375
--	-----

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

INDUCTION OF T-CELL IMMUNE RESPONSE IN CHRONIC HCV-INFECTED PATIENTS WITH UNDERLYING DENDRITIC CELL IMMUNOTHERAPY	387
---	-----

Tabakov D.V., Zabolotina T.N., Borunova A.A., Panchuk I.O., Korotkova O.V., Kadagidze Z.G.

HETEROGENEITY OF NK AND NKT LYMPHOCYTE POPULATIONS IN HEALTHY DONORS.....	401
---	-----

Toptygina A.P., Semikina E.L., Petrichuk S.V., Zakirov R.Sh., Kurbatova O.V., Kopyltsova E.A., Komakh Yu.A.

AGE-DEPENDENT CHANGES OF T-REGULATORY AND TH17 SUBSET LEVELS IN PERIPHERAL BLOOD FROM HEALTHY HUMANS	409
--	-----

Tyrinova T.V., Leplina O.Yu., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Kalinovskiy A.V., Chernov S.V., Stupak V.V., Ostanin A.A., Chernykh E.R.

INVOLVEMENT OF PERFORIN/GRANZYME B-DEPENDENT SIGNALING PATHWAY IN CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS TOWARDS HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS	421
--	-----

Gankovskaya L.V., Namazova-Baranova L.S., Khoreva M.V., Bragvadze B.G., Ogurtsova A.D., Alekseeva A.A., Gankovskii V.A., Svitich O.A.

EXPRESSION FEATURES OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND TOLL-LIKE RECEPTOR 4 IN CHILDREN WITH ASTHMA ...	431
--	-----

Davydova E.V., Zurochka A.V.

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF ADAMANTANE DERIVATIVE IN THERAPY OF ASTHENIC DISORDERS IN EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA	441
--	-----

Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Ilyenkova N.A., Konopleva O.S.

IMMUNOLOGICAL MARKERS OF UNCONTROLLED ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN.....	453
--	-----

Point of view

Shulenina E.A., Abakushina E.V., Lyssuk E.Yu.

POTENTIAL USAGE OF NK CELLS AND NKG2D-POSITIVE LYMPHOCYTES AS TARGETS IN THERAPY OF CROHN'S DISEASE	461
---	-----

Materials of XVI th Russian Forum with international participation in memory of Academician V.I. Ioffe «Immunology Days in St. Petersburg», June 5-8, 2017 (theses not included in Special Issue of the Medical Immunology Journal, 2017, vol. 19).....	471
--	-----

Anniversary	474
-------------------	-----

Chronicle	476
-----------------	-----

Instructions to Authors	479
-------------------------------	-----

Author index	482
--------------------	-----

Subject index.....	482
--------------------	-----

РАЗРАБОТКА ВАКЦИН НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ: ОБЗОР ЗАРУБЕЖНЫХ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ (ЧАСТЬ 2)

Черенова Л.В.¹, Каштиго Т.В.¹, Саядян Х.С.², Шмаров М.М.¹

¹ ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ГБОУ ВПУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. В настоящее время для многих инфекционных заболеваний человека не разработаны эффективные способы лечения и профилактики. Одним из последних достижений биотехнологии является использование аденовирусных векторов, несущих иммунодоминантные антигены различных патогенов, в качестве генно-инженерных вакцин как профилактических, так и терапевтических. Использование генно-инженерных технологий позволяет не применять при производстве вакцин живые вирусы и бактерии, сокращает время разработки и получения новых вакцинных препаратов. Аденовирусные векторы естественным путем проникают в клетки человека, вызывая довольно длительный и значительный как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ. Во второй части обзора мы планируем привести сведения о проводимых в настоящее время за рубежом клинических испытаниях вакцин на основе аденовирусных векторов против таких инфекционных заболеваний, как грипп, малярия, геморрагическая лихорадка Эбола, туберкулез, гепатит и ряда других. Будут рассмотрены параметры отбора добровольцев, схемы и дозы, используемые при вакцинации, приведены результаты завершенных экспериментов и предварительные результаты незаконченных на данный момент исследований.

Ключевые слова: аденовирусный вектор, вакцина, клинические испытания, инфекционные заболевания, аденовирус человека, аденовирус шимпанзе

DEVELOPMENT OF VACCINES BASED ON ADENOVIRAL VECTORS: A REVIEW OF FOREIGN CLINICAL STUDIES (PART 2)

Cherenova L.V.^a, Kashtigo T.V.^a, Saiadian Kh.S.^b, Shmarov M.M.^a

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

^b First Moscow I. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently, many human infectious diseases do not developed effective methods of treatment and prevention. One of the latest successes of biotechnology is the use of adenoviral vectors carrying immunodominant

Адрес для переписки:

Черенова Любовь Викторовна
ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр
эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика
Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ
123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, 18.
Тел.: 8 (916) 329-92-78.
Факс: 8 (499) 193-61-35.
E-mail: cherenova@yandex.ru

Address for correspondence:

Cherenova Liubov V.
N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and
Microbiology
123098, Russian Federation, Moscow, Gamaleya str., 18.
Phone: 7 (916) 329-92-78.
Fax: 7 (499) 193-61-35.
E-mail: cherenova@yandex.ru

Образец цитирования:

Л.В. Черенова, Т.В. Каштиго, Х.С. Саядян, М.М. Шмаров
«Разработка вакцин на основе аденовирусных
векторов: обзор зарубежных клинических исследований»
// Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 4. С. 329–358.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-329-358

For citation:

L.V. Cherenova, T.V. Kashtigo, Kh.S. Saiadian,
M.M. Shmarov "Development of vaccines based on adenoviral
vectors: a review of foreign clinical studies", Medical
Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017,
Vol. 19, no. 4, pp. 329–358.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-329-358

antigens of various pathogens as genetically engineered vaccines both preventive and therapeutic. The use of genetic engineering technologies allows not to use in the manufacture of vaccines live viruses and bacteria, reduces the time needed for vaccine creation and production of new vaccines. Adenoviral vectors naturally penetrate into human cells, causing a rather long and significant both humoral and cellular immune response. In the second part of review, we provide information about the ongoing worldwide clinical trials of adenoviral vector-based vaccines against various infectious diseases such as influenza, malaria, Ebola haemorrhagic fever, tuberculosis, hepatitis and several others, like as to consider selection parameters of volunteers, vaccination schedule, doses of drug administration, results of completed experiments, and preliminary data on currently ongoing research.

Keywords: adenoviral vector, vaccine, clinical trials, infectious diseases, human adenovirus, chimpanzee adenovirus

Введение

В первой части нашего обзора мы подробно рассмотрели общие вопросы клинических испытаний вакцин на основе аденовирусных векторов, а также заявленные для участия в зарубежных клинических испытаниях вакцины против ВИЧ [1]. Во второй части обзора мы продолжим рассматривать вакцины на основе аденовирусных векторов для профилактики и лечения различных инфекционных заболеваний, зарегистрированные как проходящие клинические испытания на добровольцах на сайте ClinicalTrials.gov. ClinicalTrials.gov – это веб-ресурс, который предоставляет доступ к базе данных об общественных и частных клинических исследованиях на добровольцах по различным заболеваниям.

Согласно данным сайта ClinicalTrials.gov, в настоящее время клинические испытания (фаза 1-4) прошли или проходят более сотни вакцин на основе аденовирусных векторов. Как правило, все разрабатываемые вакцины направлены против возбудителей, вызывающих латентные или хронические заболевания, не приводящие к выработке стерильного иммунитета, характеризующиеся внутривидовой изменчивостью, что препятствует созданию для данных заболеваний эффективных вакцин классическими методами или снижает эффективность существующих вакцин, защищающих только от определенных штаммов, требуя индивидуального подхода для создания вакцинных препаратов.

Применение аденовирусов в качестве векторов обусловлено их хорошей изученностью, естественным механизмом взаимодействия с клеткой и проникновения в клетку, способностью обеспечивать довольно длительную экспрессию антигена, способностью активировать врожденный иммунный ответ. Все полученные до настоящего времени научные данные подтверждают безопасность вакцин на основе аденовирусов, так как в репликативно-дефектной форме они не патогенны для человека и не интегрируют в клеточный геном.

В данной части обзора мы подробно остановимся на вакцинах против вируса гриппа, малярии, вируса Эбола, туберкулеза, гепатита, респираторно-синцитиального вируса и сибирской язвы на основе аденовирусных векторов, участвующих в зарубежных клинических испытаниях.

Вакцины против вируса гриппа (табл. 1)

Против сезонного вируса гриппа и вируса птичьего гриппа заявлены клинические испытания вакцин на основе Ad5 (Ad-HA-dsRNA или ND1.1 против птичьего гриппа и VXA-A1.1 против сезонного гриппа, VXA-BYW.10, AdhVN1203/04. H5) и Ad4 (Ad4-H5-Vt). Оба аденовируса хорошо изучены, безопасны, давно используются в генной терапии, одним из их преимуществ является естественный механизм проникновения в клетки человека. При этом для большинства испытуемых вакцин используется пероральный или интраназальный способ доставки, что позволяет получить устойчивый мукозальный иммунный ответ и обойти возможный предсуществующий иммунитет к аденовирусному вектору [34]. Результаты большинства исследований не представлены, однако в 2013 году Vaxart Inc. опубликовала результаты клинических испытаний вакцины ND1.1, которая представляет собой вектор на основе Ad5, несущий ген гемагглютиниона птичьего вируса гриппа H5, и адъювант dsRNA, действующий как лиганд для Toll-подобных рецепторов (TLR3). В этой работе впервые была продемонстрирована иммуногенность вакцины при пероральном приеме в виде капсул [20]. Исследование показало хорошую переносимость вакцины, у 73% испытуемых наблюдалась выработка IFN γ , хотя Т-клеточный иммунный ответ был слабым. Однако, хотя титры антигемагглютинирующих антител были повышенные, вируснейтрализующие антитела не были обнаружены ни у одного испытуемого. В параллельном исследовании подобная вакцина принималась добровольцами в виде таблеток, при этом была продемонстрирована ее безопасность и хорошая переносимость, а также способность вызывать образование вируснейтрализующих антител к вирусу гриппа

у человека [15]. Как отмечается, наличие у испытуемых предсуществующего иммунитета к вектору на основе Ad5 не влияло на выработку вируснейтрализующих антител к вирусу гриппа.

В том же году PaxVax Inc. опубликовала результаты клинических испытаний вакцины Ad4-H5-Vt на основе живого репликативно-компетентного рекомбинантного Ad4, экспрессирующего ген гемагглютинина вируса гриппа A/Vietnam/1194/2004 (H5N1), в кишечнорастворимых капсулах для перорального приема. В данном исследовании аденовирусная вакцина использовалась в качестве прайм-вакцины, а в качестве буст-вакцины испытуемые получали субвирионную инактивированную вакцину (Sanofi Pasteur Influenza Virus Vaccine [H5N1]). При этом наблюдалось увеличение титров анти-гемагглютинирующих антител, а также более значительным был Т-клеточный иммунный ответ на вакцину и уровни IFN γ , особенно в группе с наивысшей дозой вакцины (1×10^{11} вч) [11]. Таким образом, предлагаемая вакцина может быть использована в качестве прайм-вакцины для повышения эффективности существующих слабоиммуногенных вакцин против вируса гриппа. Предсуществующий к Ad4 иммунитет не нарушал развитие гуморальных и клеточных реакций у испытуемых. У некоторых добровольцев с помощью ПЦР было детектировано выделение вакцинного вируса, однако симптомов заболевания ОРЗ не наблюдалось, также не наблюдалось выделения вируса среди окружения испытуемых.

Вакцины против малярии (табл. 2)

Сложный цикл развития малярийного плазмодия препятствует появлению эффективной вакцины против этого заболевания. Для борьбы с малярией в настоящее время преимущественные усилия направлены на решение двух задач: во-первых — получить вакцину с 50% защитой от тяжелого течения заболевания или заболевания со смертельным исходом на протяжении 12 месяцев, во-вторых — получить вакцину с 80% эффективностью на более длительный период против клинической малярии, при этом используется множество разнообразных подходов к решению данных задач. В основном предлагаемые вакцины направлены либо на выработку антител против антигенов спорозоитов малярийного плазмодия, препятствующих проникновению его в печень, и зараженных им клеток печени, то есть так называемая пре-эритроцитарная вакцина, либо на уничтожение малярийного плазмодия в крови человека [21]. Для векторов на основе аденовирусов в лечении и профилактике малярии наиболее эффективным подходом являются схемы прайм-буст вакцинации, позволяющие

увеличить иммунный ответ, и использование векторов с ограниченным или отсутствующим предсуществующим иммунным ответом. Одной из вакцин против малярии, проходящей клинические испытания, является вакцина на основе Ad5. Вакцина NMRC-M3V-Ad-PfCA представляет собой смесь двух репликативно-дефектных аденовекторов, экспрессирующих антигены малярийного плазмодия CS и AMA1. На серонегативных и серопозитивных по отношению к Ad5 добровольцах были исследованы различные дозы и схемы введения вакцины. Согласно результатам эксперимента, вакцина безопасна, хорошо переносится, вызывает иммунный ответ продолжительностью до 12 месяцев (иммунный ответ был выше в группе с низкой дозой вакцины), как гуморальный, так и клеточный, но не обеспечивает стерильную защиту [22, 30]. В схеме с однократным внутримышечным введением вакцины уровень гуморального иммунного ответа был низким, хотя клеточный иммунный ответ на антигены малярийного плазмодия наблюдался у 56% испытуемых для CS-антигена и у 100% для AMA1. После экспериментального заражения малярией только один испытуемый продемонстрировал задержку развития паразитемии [31]. Таким образом, применение аденовекторов для вакцинации оправдано лишь при использовании схемы прайм-буст вакцинации, что и было продемонстрировано в схеме, когда вакцину на основе аденовирусного вектора вводили после праймирования испытуемых ДНК-вакциной, несущей такие же антигены. В результате 4 добровольцев (27%) продемонстрировали стерильный иммунитет к контролируемому заражению их малярийным плазмодием, при этом защита от заражения была связана с клеточно-опосредованным иммунитетом преимущественно к AMA1 антигену [3, 23]. Введение только вакцины на основе аденовирусного вектора хоть и вызывает более значительные клеточные иммунные реакции, чем при схеме вакцинирования с предварительным праймированием ДНК-вакциной, тем не менее защиты от малярии не обеспечивает [24].

Еще один тип вакцины против малярии, проходящей клинические испытания — Ad35.CS.01 — на основе Ad35, экспрессирующего ген CS малярийного плазмодия, с использованием разных схем вакцинации: гомологичной прайм-буст вакцинации, гетерологичной вакцинации в комбинации с вакциной на основе Ad26 (NCT01397227) и с вакциной 257049 (NCT01366534), разработанной GSK (GlaxoSmithKline). Исследование вакцины Ad35.CS.01 в четырех разных дозах продемонстрировало ее безопасность и средний уровень иммуногенности среди добровольцев

ТАБЛИЦА 1. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ПРОТИВ ВИРУСА ГРИППА

TABLE 1. VACCINES AGAINST INFLUENZA VIRUS BASED ON ADENOVIRAL VECTORS

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase	Дозы и методы введения Doses and methods of administration
Аденовирус человека 5 серотипа Human adenovirus serotype 5	Ad-HA-dsRNA (VXA-A1.1), Vaxart Inc. Содержит ген гемагглютинаина вируса гриппа А H1N1 и адъювант двухцепочечная РНК Ad-HA-dsRNA (VXA-A1.1), Vaxart Inc, contains a gene of influenza virus A H1N1, haemagglutinin and double-stranded RNA as an adjuvant	Фаза 1 Phase 1	Перорально в виде таблеток, низкие и средние одна или две дозы, одна высокая доза. На следующем этапе капсулы доставляются в подвздошную кишку с помощью радио-управляемого зонда Oral tablets, once or twice at low and average doses, or a single high dose. At next step, the capsules are delivered to ileum, by means of radio-controlled capsule
	Ad-HA-dsRNA (ND1.1), Vaxart Inc. Содержит ген гемагглютинаина вируса гриппа птиц H5N1 и адъювант двухцепочечная РНК Ad-HA-dsRNA (ND1.1), Vaxart Inc. Ad5 contains haemagglutinin gene of A H5N1 influenza virus and TLR3 ligand as an adjuvant	Фаза 1 Phase 1	Перорально в виде капсул, в дозе от 1×10^8 до 1×10^{10} вч. На следующем этапе капсулы доставляются в подвздошную кишку с помощью радио-управляемого зонда Oral capsules at a dose of 1×10^8 to 1×10^{10} vp. At next step, the capsules are delivered to the ileum with a radio controlled capsule
	VXA-BYW.10, Vaxart Inc. Против вируса гриппа В, состав не уточняется VXA-BYW.10, Vaxart Inc. Against influenza virus B, composition is not specified	Фаза 1 Phase 1	Перорально в виде таблеток, низкая или высокая доза Oral tablets, low or high dose
	AdhVN1203/04.H5, Altimune, Inc. Содержит ген гемагглютинаина вируса гриппа птиц H5N1 AdhVN1203/04.H5, Altimune, Inc. Ad5 contains the gene of haemagglutinin avian influenza virus H5N1	Фаза 1 Phase 1	Интраназально в виде спрея, две дозы, 10^8-10^{10} вч Intranasal spray, two doses, 10^8 to 10^{10} vp

Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна и иммуногенна. После иммунизации у 92% испытуемых опытной группы наблюдалось четырехкратное увеличение титров антител в реакции торможения гемагглютинации и в реакции микронейтрализации. Предсуществующий иммунный ответ к вектору не влиял на выработку вирус-нейтрализующих антител к вирусу гриппа. Доставка вакцины с помощью радиоуправляемых капсул успешна. Иммунный ответ зависит от дозы вакцины, выработка антител к целевому антигену наблюдалась на 28 день у всех добровольцев в группе с высокой дозой и у 8 из 12 добровольцев в группе с низкой дозой [15] The vaccine is safe and immunogenic. After immunization, 92% of participants in experimental group showed a 4-fold increased titers in haemagglutination inhibition and micro-neutralisation tests. Pre-existing immune response to the vector did not affect production of virus-neutralizing antibodies to influenza virus. Delivery of the vaccine using a radio controlled capsule was successful. Induction of immune response depends on the vaccine dose. Production of antibodies against the target antigen was observed on day 28 for all volunteers from the high-dose group, and for 8 of 12 volunteers in the low-dose group [15]
Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна и иммуногенна. Уровень иммунного ответа зависит от дозы вакцины [20] The vaccine is safe and immunogenic. Immune response depends on the vaccine dose [20]
Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published
Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase	Дозы и методы введения Doses and methods of administration
Аденовирус человека 4 серотипа Human adenovirus serotype 4	Ad4-H5-Vtn, PaxVax, Inc. Живой, репликативно-компетентный аденовирус, экспрессирующий ген гемагглютинаина H5N1 вируса гриппа A/Vietnam/1194/2004 Ad4-H5-Vtn, PaxVax, Inc. A live, replication-competent adenovirus, expressing a haemagglutinin gene of H5N1 influenza virus (A/Vietnam/1194/2004)	Фаза 1 Phase 1	Перорально в виде капсул, 3-кратная вакцинация в дозе 10^7-10^{11} вч, затем буст-вакцина Sanofi Pasteur Influenza Virus Vaccine (H5N1) Oral capsules, triple vaccination at the doses of 10^7 to 10^{11} vp, followed by a boost with Sanofi Pasteur Influenza Virus Vaccine (H5N1)
	Ad4-H5-Vtn, NIAID. Живой, репликативно-компетентный аденовирус, экспрессирующий ген гемагглютинаина H5N1 вируса гриппа A/Vietnam/1194 Ad4-H5-Vtn, NIAID. A live, replication-competent adenovirus, expressing haemagglutinin of H5N1 influenza virus (A/Vietnam/1194)	Фаза 1 Phase 1	Интраназальное, тонзиллярное и пероральное введение в капсулах – дозы от 10^3 до 10^8 вч Intranasal, tonsillar and oral capsules at the doses of 10^3 to 10^8 vp

из Буркина-Фасо [19]. Вакцина индуцировала гуморальный и клеточный ($CD8^+$) иммунный ответ на антиген, иммунный ответ на аденовирусный вектор при этом был незначительным. В схеме прайм-буст вакцинации Ad35.CS.01/GSK257049 предварительное введение аденовектора не обеспечивало развитие более значительной защиты добровольцев от заражения малярийным плазмодием по сравнению с режимом трехкратных инъекций вакцины GSK. При этом уровень Т-клеточного иммунного ответа в группе, получившей инъекцию аденовирусного вектора, был более высоким [17]. Результаты еще одного исследования не опубликованы.

Одним из перспективных направлений разработки вакцин против малярии считаются вакцины на основе ChAd63, экспрессирующие различные антигены – CS, AMA1 и ME-TRAP – в гетерологичных (с вирусом осповакцины MVA) прайм-буст схемах вакцинации. Вакцина AdCh63 ME-TRAP в комбинации с вакциной MVA ME-TRAP продемонстрировала свою безопасность, при этом наименьшее количество неблагоприятных поствакцинальных событий наблюдалось при внутримышечном способе иммунизации.

Иммунизация добровольцев AdCh63 ME-TRAP в дозах 5×10^{10} вч и выше вызывала высокий уровень Т-клеточного иммунного ответа (как $CD4^+$, так и $CD8^+$), а последующее введение MVA ME-TRAP еще больше усиливало иммунный ответ, который сохранялся на протяжении более 30 месяцев после вакцинации [18]. При заражении испытуемых гетерологичным штаммом малярийного плазмодия у 3 из 14 человек (21%) наблюдали стерильный иммунитет к малярии, а у 5 (36%) задержку печеночной стадии развития малярийного плазмодия [7]. Вакцина AdCh63 CS и вакцина MVA CS в гетерологичных схемах прайм-буст вакцинации показали свою безопасность и иммуногенность, вызывая значительный иммунный ответ против CS-антигена малярийного плазмодия (в основном Т-клеточный иммунный ответ). Уровни IgG были достаточно скромными, достигали пика на 14 день после введения AdCh63 CS, однако детектировались и на протяжении всего позднего периода наблюдений [5]. Комбинация вакцины AdCh63 AMA1 и MVA AMA1 также безопасна и иммуногенна, при этом вызывает образование не только высокого уровня Т-клеточного

Таблица 1 (окончание)
Table 1 (continued)

Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна, но в опытной группе наблюдалось больше случаев возникновения боли в животе, заложенности носа, диареи. У ряда добровольцев, получивших вакцину, на 14 день детектировалось наличие Ad4, но у их окружения методом ПЦР вирус не детектировался. Вакцина вызывает значительный гуморальный и клеточный иммунный ответ, введение буст-вакцины увеличивает уровень гуморального иммунного ответа. Подобная вакцина в качестве прайм-вакцины может повысить эффективность слабоиммуногенных вакцин против вируса гриппа [11] The vaccine is safe, but there were more cases of abdominal pain, nasal congestion, diarrhea in experimental group. Some volunteers who received the vaccine, presence of Ad4 was detected on day 14, but the virus was not detectable by PCR in their environment. The vaccine induces significant humoral and cellular immune response, a boost vaccine injection increases humoral immune response. Such a vaccine, as a prime vaccine, may enhance efficacy of poorly immunogenic vaccines against influenza virus [11]
Здоровые добровольцы, с предсуществующим иммунитетом к Ad4 и без него Healthy volunteers with/without pre-existing immunity to Ad4	Не опубликованы Not published

иммунного ответа, но и значительный AMA1-специфический сывороточный IgG ответ [26].

Вакцины против вируса Эбола (табл. 3)

Среди заявленных в последние годы клинических исследований большинство составляют испытания вакцин против вируса Эбола. В частности, одно из первых исследований – это изучение безопасности и иммуногенности, а также отсутствия влияния предсуществующего иммунитета на вакцину VRC-EBOADV018-00-VP на основе Ad5, несущего гены гликопротеинов вируса Эбола штаммов Заир и Судан-Гулу (NCT00374309). Вакцина представляет собой смесь двух репликативно-дефектных аденовекторов. Результаты исследования не представлены. Еще одна изучаемая вакцина на основе Ad5, представленная китайскими учеными – Ad5-EBOV – аденовирусный вектор, несущий ген гликопротеина вируса Эбола эпидемического штамма Заир 2014 года. Добровольцы получили высокую либо низкую дозу вакцины, при этом никаких серьезных побочных эффектов и последствий вакцинации в обеих группах выявлено не было. Титр гликопротеин-специфических антител значительно увеличивался в обеих группах начиная с 14 дня,

а Т-клеточный иммунный ответ достигал максимума также на 14 день после вакцинации после однократного введения вакцины [35]. На следующих этапах, заявленных в 2015 году, планируется исследование данной вакцины на добровольцах африканского происхождения, проживающих в Китае, а также изучение возможности повышения иммунного ответа на введение вакцины в гомологичной прайм-буст схеме.

Среди исследований Crucell Holland BV – изучение вакцины на основе Ad26, несущего ген гликопротеина вируса Эбола штамм Заир (Ad26. ZEBOV). Данный вектор предлагается использовать в различных дозах, разной последовательности и разных схемах введения в режиме гомологичной прайм-буст вакцинации или гетерологичной совместно с вектором на основе модифицированного вируса осповакцины (MVA-BN-filo, Modified Vaccinia Virus Ankara – Bavarian Nordic Filo-vector, несущий антигены гликопротеинов штаммов Таиланд, Заир, Судан и вируса Марбурга). Согласно предварительным данным, результаты экспериментов выглядят многообещающе, при этом режим введения Ad26/MVA является более иммуногенным [28]. Через 28 дней

ТАБЛИЦА 2. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ПРОТИВ МАЛЯРИИ

TABLE 2. VACCINES AGAINST MALARIA BASED ON ADENOVIRAL VECTORS

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 5 серотипа Human adenovirus serotype 5	NMRC-M3V-Ad-PfCA (AdCA), U.S. Army Medical Research and Materiel Command. Используется как отдельно, так и совместно с ДНК-вакциной NMRC-M3V-D-PfCA. Содержит два аденовектора, несущих антигены CSP (circumsporozoite protein) и ген AMA1 (apical membrane antigen 1) NMRC-M3V-Ad-PfCA (AdCA), U.S. Army Medical Research and Materiel Command. Used both separately and combined with NMRC-M3V-D-PfCA DNA-vaccine. Contains two adenovectors expressing CSP (circumsporozoite protein) and AMA1 (apical membrane antigen 1) antigens	Фаза 1/2 Phase 1/2
Аденовирус человека 35 серотипа Human adenovirus serotype 35	Ad35.CS.01, NIAID. Содержит антиген CS (circumsporozoite) Ad35.CS.01, NIAID. Contains a CS (circumsporozoite) antigen	Фаза 1 Phase 1
	Ad35.CS.01, GlaxoSmithKline и Crucell Holland BV. Совместно с вакциной GSK (Biologicals' malaria vaccine 257049). Содержит антиген CS (circumsporozoite) Ad35.CS.01, GlaxoSmithKline и Crucell Holland BV. Applied together with GSK vaccine (Biologicals' malaria vaccine 257049). Contains CS antigen (circumsporozoite)	Фаза 2 Phase 2

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Прайм-буст схема, аденовирус используется как буст-вакцина. Доза ДНК-вакцины 2 мг, доза аденовирусной вакцины 2×10^{10} вч A prime-boost scheme, the adenovirus is used as a boost vaccine. Dose of the DNA-vaccine is 2 mg, and adenovirus vaccine dose is 2×10^{10} vp	Здоровые добровольцы с предсуществующим иммунитетом к Ad5 и без него Healthy volunteers with/without pre-existing immunity to Ad5	Вакцина безопасна, хорошо переносится. Показана индукция клеточного и гуморального иммунного ответа на введение вакцины [22, 30, 31]. Статистически значимый уровень защиты от последующего введения добровольцам возбудителей малярии показан при использовании экспериментальной вакцины совместно с предварительной ДНК-иммунизацией. Защита от заражения малярией наблюдалась у 27% испытуемых [3, 23]. Использование одного аденовирусного вектора для вакцинации не дает защитный эффект, несмотря на наличие иммунного ответа [24] The vaccine is safe, well tolerated. Induction of cellular and humoral immune response to the vaccine has been shown [22, 30, 31]. A statistically significant protection level against subsequent injection of volunteers to malaria-causing agents are shown with experimental vaccine, when combined with preliminary DNA immunization. Protection from malarial infection was observed in 27% of subjects [3, 23]. Using a single adenovirus vector for vaccination provides a protective effect, despite induction of immune response [24]
Внутримышечные инъекции в дозе 10^9-10^{11} вч Intramuscular injection at the doses of 10^9 to 10^{11} vp	Здоровые добровольцы с и без предсуществующего иммунитета к Ad35 Healthy volunteers with/without pre-existing immunity to Ad35	Вакцина безопасна, хорошо переносится. Показан специфический гуморальный и клеточный иммунный ответ к CS. Не вызывает значительного образования вирус-нейтрализующих антител против Ad35 [19] The vaccine is safe, well tolerated. Induces specific humoral and cellular immune response to CS. No significant development of virus-neutralizing antibodies against Ad35 [19]
Внутримышечная инъекция одной дозы Ad35, затем двух доз GSK вакцины. В сравнении с тремя дозами GSK вакцины Intramuscular injection of a single-dose Ad35, followed by two doses of GSK vaccine, in comparison with three doses of GSK vaccine	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна, хорошо переносится. Предварительное введение аденовектора не обеспечивало развития более значительной защиты от заражения малярийным плазмодием по сравнению с режимом трехкратных инъекций вакцины GSK. При этом уровень Т-клеточного иммунного ответа в группе, получившей инъекцию аденовирусного вектора, был более высоким [17] The vaccine is safe, well tolerated. Prior administration of adenovector did not ensure a more strong protection from Malaria plasmodium infection, in contrast to triple injections of the GSK vaccine. Meanwhile, the levels of T-cell immune response was higher for the group that received adenoviral vector injections [17]

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 26 и 35 серотипа Human adenovirus, serotypes 26 and 35	Ad35.CS.01 и Ad26.CS.01, Crucell Holland BV. Содержат антиген CS (circumsporozoite) Ad35.CS.01 и Ad26.CS.01, Crucell Holland BV Contain antigens CS (circumsporozoite)	Фаза 1/2 Phase 1/2
Аденовирус шимпанзе 63 серотипа Chimpanzee adenovirus serotype 63	AdCh63 ME-TRAP, University of Oxford. Как отдельно, так и совместно с поксвирусом MVA ME-TRAP. Содержит ген ME-TRAP (pre-erythrocytic thrombospondin-related adhesion protein) AdCh63 ME-TRAP, University of Oxford. Used both separately and together with MVA ME-TRAP poxvirus. Contains ME-TRAP antigen (pre-erythrocytic thrombospondin-related adhesion protein)	Фаза 1/2 Phase 1/2
	AdCh63 AMA1, University of Oxford. Как отдельно, так и совместно с поксвирусом MVA AMA1. Содержит ген AMA-1 (apical membrane antigen-1) Used both separately and together with poxvirus MVA AMA1. Contains antigen AMA-1 (apical membrane antigen -1)	Фаза 1 Phase 1
	AdCh63 CS, University of Oxford. Как отдельно, так и совместно с поксвирусом MVA CS. Содержат ген CS (circumsporozoite) AdCh63 CS, University of Oxford. Used both separately and combined with MVA CS poxvirus. Contains CS (circumsporozoite) antigen	Фаза 1 Phase 1

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Прайм-буст схема, внутримышечные инъекции в дозе $1-5 \times 10^{10}$ вч A prime-boost schedule, intramuscular injection at the doses of 1 to 5×10^{10} vp	Здоровые добровольцы без предсуществующего иммунитета к Ad26 и Ad35 Healthy volunteers with/without pre-existing immunity to Ad26 and Ad35	Не опубликованы Not published
Внутрикожные и внутримышечные инъекции AdCh63 ME-TRAP в дозе $1 \times 10^8 - 2 \times 10^{11}$ вч. Либо прайм-буст схема совместно с поксвирусом в дозе 2×10^8 БОЕ. На следующем этапе вакцинация внутримышечно по прайм-буст схеме AdCh63 ME-TRAP в дозе 5×10^{10} вч, MVA ME-TRAP в дозе 2×10^8 БОЕ, затем заражение спорозоитами Intradermal and intramuscular injections AdCh63 ME-TRAP $1 \times 10^8 - 2 \times 10^{11}$ vp or prime-boost scheme together with poxviruses 2×10^8 PFU. The next phase of the vaccination intramuscularly by prime-boost scheme AdCh63 ME-TRAP 5×10^{10} vp and MVA ME-TRAP 2×10^8 PFU, followed by sporozoite infection	Здоровые добровольцы, большинство без предсуществующего иммунитета к ChAd63. Healthy volunteers, most without pre-existing immunity to ChAd63	Вакцина безопасна и иммуногенна. При внутримышечном способе введения вакцин неблагоприятные последствия менее выражены. Различий в иммунном ответе для разных способов введения вакцины не выявлено. В группе с вакцинацией по прайм-буст схеме уровень гуморального и клеточного иммунного ответа был более высоким [18]. После вакцинации у большинства добровольцев детектировались антитела к аденовирусу шимпанзе. Наличие предсуществующего иммунного ответа к аденовирусу не влияло на иммуногенность вакцины. Показана полная защита от заражения малярийным плазмодием у 3 из 14 участников, частичная защита у 5 из 14 [7] The vaccine is safe and immunogenic. Adverse effects are less pronounced by intramuscular route of vaccination. Differences in immune response are not detected with different methods of the vaccine administration. In the group with prime-boost vaccination scheme, higher levels of humoral and cellular immune response were revealed [18]. After vaccination, antibodies to chimpanzee adenovirus were detected in majority of volunteers. Pre-existing immune response to adenovirus did not affect immunogenicity of the vaccine. Complete protection from malaria infection was shown in 3 of 14 participants, while partial protection was observed in 5 of 14 cases [7]
Внутримышечная инъекция аденовируса в дозе $5 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$ вч, либо прайм-буст схема с поксвирусом в дозе 5×10^8 БОЕ Intramuscular injection of adenovirus $5 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$ vp or prime-boost scheme with poxviruses 5×10^8 PFU	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна и иммуногенна. При использовании схемы прайм-буст вакцинации наблюдается более значительный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Уровень предсуществующего иммунного ответа на аденовирус шимпанзе не влияет на иммуногенность вакцины [26] The vaccine is safe and immunogenic. When using a prime-boost vaccination schedule, it provides a more significant humoral and cellular immune response. Preexisting immune response to chimpanzee adenovirus does not affect immunogenicity of the vaccine [26]
Внутримышечная инъекция аденовируса в дозе $5 \times 10^9 - 5 \times 10^{10}$ вч, либо прайм-буст схема с поксвирусом в дозе 5×10^8 БОЕ Intramuscular injection of adenovirus 5×10^9 to 5×10^{10} vp, or prime-boost scheme with poxviruses 5×10^8 PFU	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна и иммуногенна. Вызывает значительный гуморальный и клеточный иммунный ответ. Гуморальный иммунный ответ достаточно длительный (140 дней) [5] The vaccine is safe and immunogenic, it induces significant humoral and cellular immune response. Humoral immune response is quite durable (140 days) [5]

ТАБЛИЦА 3. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ПРОТИВ ВИРУСА ЭБОЛА

TABLE 3. VACCINES AGAINST EBOLA VIRUS BASED ON ADENOVIRAL VECTORS

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 5 серотипа Human adenovirus, serotype 5	VRC-EBOADV018-00-VP (Ebola-rAd5), NIAID. Содержит два аденовирусных вектора, несущих гены гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир и штамм Судан-Гулу VRC-EBOADV018-00-VP (Ebola-rAd5), NIAID. Contains two adenoviral vectors carrying glycoprotein (GP) genes of Ebola virus, Zaire and Sudan-Gulu strains	Фаза 1 Phase 1
	Ad5-EBOV, Jiangsu Province Centers for Disease Control and Prevention. Содержит ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир Ad5-EBOV, Jiangsu Province Centers for Disease Control and Prevention. Contains the glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire strain	Фаза 1/2 Phase 1/2
Аденовирус человека 26 серотипа Human adenovirus, serotype 26	Ad26.ZEBOV, Crucell Holland BV. Содержит ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир. Совместно с поксвирусом MVA-BN-Filo (Bavarian Nordic), содержащим гены GP штамма Таиланд, Заир, Судан и вируса Марбурга Ad26.ZEBOV, Crucell Holland BV Contains the glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire strain. Applied together with MVA-BN-Filo poxvirus (Bavarian Nordic) containing GP genes from Thailand, Zaire, Sudan strains and Marburg virus	Фаза 4 Phase 4
Аденовирус человека 26 серотипа и аденовирус шимпанзе 3 серотипа Human adenovirus serotype 26 and chimpanzee adenovirus, serotype 3	Ad26.ZEBOV и ChAd3-EBO-Z, University of Oxford. Содержат ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир Ad26.ZEBOV и ChAd3-EBO-Z, University of Oxford. Contain a glycoprotein (GP) gene from Ebola virus, Zaire strain	Фаза 1 Phase 1

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Внутримышечно в дозе 2×10^9 - 2×10^{11} вч Intramuscularly at a dose of 2×10^9 to 2×10^{11} vp	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published
Внутримышечно в высокой и низкой дозе, затем повторная вакцинация в дозе 4×10^{10} вч либо одновременно две дозы по $0,8 \times 10^{11}$ вч. В эксперименте в Сьерра-Леоне две дозы по 4×10^{10} вч одновременно или две дозы по 8×10^{10} вч одновременно Intramuscularly at low and high doses, followed by a booster vaccination at a dose of 4×10^{10} vp or a double dose of 0.8×10^{11} vp. During a trial in Sierra Leone, two doses of 4×10^{10} vp at a time, or two doses on 8×10^{10} vp at a time	Здоровые добровольцы, в том числе уроженцы Африки, проживающие в Китае и Сьерра-Леоне Healthy volunteers, including native Africans, living in China and Sierra Leone	Вакцина безопасна и иммуногенна. Однократное введение высокой дозы вакцины вызывает образование гуморального и клеточного иммунного ответа против вируса Эбола [35] The vaccine is safe and immunogenic. A single high-dose injection of the vaccine causes induction of humoral and cellular immune response against Ebola virus [35]
Внутримышечно, различные прайм-буст схемы в дозе 5×10^{10} вч для аденовектора и 1×10^8 БОЕ для поксвируса Intramuscularly, different prime-boost schemes at the doses of 5×10^{10} vp for adenovector, and 1×10^8 PFU for poxvirus	Здоровые добровольцы, а также дети, пожилые люди, беременные женщины и рожденные у добровольцев дети, ВИЧ-инфицированные. Долгосрочное исследование в нескольких странах Healthy volunteers, children, elderly persons, pregnant women and children of the volunteers, HIV-infected persons. Long-term study performed in several countries	Вакцина безопасна и иммуногенна. Гуморальный иммунный ответ детектировался у добровольцев через 28 дней после первичной иммунизации Ad26.ZEBOV. После введения буст-вакцины MVA-BN-Filo гуморальный иммунный ответ детектировался на протяжении 8 месяцев. В рандомизированных группах на 7 день после введения буст-вакцины детектировали специфический Т-клеточный иммунный ответ к вирусу Эбола [16] The vaccine is safe and immunogenic. Humoral immune response was detected in the volunteers after 28 days of primary immunization of Ad26.ZEBOV. After the introduction of the boost vaccine MVA-BN-Filo humoral immune response detected for 8 months. In the randomized groups at day 7 after administration of the boost vaccine were detected specific T-cell immune response to Ebola virus [16]
Различные прайм-буст схемы, для Ad26.ZEBOV доза 5×10^{10} вч, для ChAd3-EBO-Z доза 1×10^{11} вч Different prime-boost schemes, a dose of 5×10^{10} vp for Ad26.ZEBOV, and 1×10^{11} vp for ChAd3-EBO-Z	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус шимпанзе 3 серотипа Chimpanzee adenovirus, serotype 3	VRC-EBOADC069-00-VP (cAd3-EBO), NIAID. Два аденовирусных вектора, содержат гены гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир и штамм Судан-Гулу VRC-EBOADC069-00-VP (cAd3-EBO), NIAID. Two adenoviral vectors containing glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire and Sudan-Gulu strains	Фаза 1 Phase 1
	cAd3-EBO, University of Maryland. Совместно с поксвирусом MVA-EbolaZ, содержащим ген (GP) вируса Эбола штамм Заир cAd3-EBO, University of Maryland. Together with MVA-EbolaZ poxvirus containing a GP gene from Ebola virus, Zaire strain	Фаза 1 Phase 1
	cAd3-EBOZ, University of Lausanne Hospitals. Содержит ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир cAd3-EBOZ, University of Lausanne Hospitals. Contains the glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire strain	Фаза 1/2 Phase 1/2
	VRC-EBOADC076-00-VP (cAd3-EBOZ), NIAID. Содержит ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир VRC-EBOADC076-00-VP (cAd3-EBOZ), NIAID. Contains the glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire strain	Фаза 1 Phase 1
	cAd3-EBOZ, University of Maryland. cAd3-EBOZ содержит ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир. Совместно с поксвирусом MVA-BN-Filo, содержащим гены GP штамма Таиланд, Заир, Судан и вируса Марбурга cAd3-EBOZ, University of Maryland. cAd3-EBOZ contains the glycoprotein (GP) gene of of Ebola virus, Zaire strain. Used together with MVA-BN-Filo poxvirus, which contains GP genes from Thailand, Zaire, Sudan strains, and Marburg virus	Фаза 1 Phase 1

Таблица 3 (продолжение)
Table 3 (continued)

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Внутримышечно в дозе 2×10^{10} - 2×10^{11} ОЕ, как отдельно, так и совместно с ДНК-вакциной 2×10^{10} - 2×10^{11} PU intramuscularly, both separately and combined with DNA-vaccine	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна и иммуногенна. Однократное введение вакцины вызывает образование гуморального и клеточного иммунного ответа. У добровольцев с высоким предсуществующим иммунитетом к аденовектору наблюдался пониженный уровень Т-клеточного иммунного ответа [13] The vaccine is safe and immunogenic. Single administration of the vaccine induces humoral and cellular immune response. In volunteers with high pre-existing immunity to adenovector, a reduced level of T-cell immune response was observed [13]
Внутримышечно в дозе 2×10^{10} - 2×10^{11} вч для аденовектора. Затем добровольцам будут вводить либо поксвирус, либо плацебо Intramuscularly, 2×10^{10} to 2×10^{11} vp for adenovector. Thereafter, the volunteers will be administered either poxvirus, or placebo	Здоровые добровольцы из Мали Healthy volunteers from Mali	Не опубликованы Not published
Единичные инъекции в дозе $2,5-5 \times 10^{10}$ вч A single injection at a dose of 2.5 to 5×10^{10} vp	Здоровые добровольцы из Швейцарии Healthy volunteers from Switzerland	Вакцина безопасна и иммуногенна. Единичная доза вакцины вызывает образование длительного гуморального иммунного ответа (до 6 месяцев). Не наблюдалось значительных различий в безопасности и иммуногенности вакцины в зависимости от вводимой дозы [6] The vaccine is safe and immunogenic. A single dose of the vaccine causes induction of long-lasting humoral immune response (up to 6 months). There were no significant differences in safety and immunogenicity of the vaccine, depending on the dose administered [6]
Внутримышечно в дозе 1×10^{10} - 10^{11} вч Intramuscularly, 1×10^{10} to 10^{11} vp	Здоровые добровольцы из США Healthy volunteers from the USA	Вакцина безопасна и иммуногенна [32] The vaccine is safe and immunogenic [32]
Внутримышечно в дозе $1-5 \times 10^{10}$ вч, затем в качестве буст-вакцины будет введен поксвирус Intramuscularly, at a dose of $1-5 \times 10^{10}$ vp, followed by injection of poxvirus as a boost vaccine	Здоровые добровольцы из Мали Healthy volunteers from Mali	Вакцина безопасна. Комбинация с поксвирусом может использоваться для формирования длительного иммунного ответа против вируса Эбола [32] The vaccine is safe. A combination with poxvirus could be used for induction of long-lasting immune response against Ebola virus [32]

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vectors	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус шимпанзе 3 серотипа Chimpanzee adenovirus, serotype 3	ChAd3-EBO-Z (GSK3390107A), GlaxoSmithKline. Содержит ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир ChAd3-EBO-Z (GSK3390107A), GlaxoSmithKline. Contains a glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire strain	Фаза 2 Phase 2
	cAd3-EBO Z совместно с поксвирусом MVA-BN-Filo либо MVA-EBO Z, University of Oxford. cAd3-EBO Z и MVA-EBO Z содержат ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир. MVA-BN-Filo содержит гены GP штамма Таиланд, Заир, Судан и вируса Марбурга cAd3-EBO Z together with MVA-BN-Filo or MVA-EBO Z poxviruses, University of Oxford. cAd3-EBO Z and MVA-EBO Z contain the glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire strain. MVA-BN-Filo virus contains GP genes from Thailand, Zaire, Sudan strains, and Marburg virus	Фаза 1 Phase 1
	ChAd3-EBO Z совместно с VSVG-ZEBOV (вирус везикулярного стоматита), NIAID. Содержат ген гликопротеина (GP) вируса Эбола штамм Заир ChAd3-EBO Z together with VSVG-ZEBOV (vesicular stomatitis virus). Contain a glycoprotein (GP) gene of Ebola virus, Zaire strain	Фаза 2 Phase 2

Таблица 3 (окончание)
Table 3 (continued)

Дозы и методы введения Doses and methods of administration	Параметры отбора добровольцев Selection criteria for the volunteers	Результаты Results
Внутримышечно единичные дозы, для детей прайм-буст схема совместно с MENACWY-TT (менингококковая вакцина) A single intramuscular injection; a prime-boost scheme combined with MENACWY-TT (meningococcal vaccine) will be used for children	Здоровые добровольцы, в том числе дети, из Африки Healthy volunteers, including children, from Africa	Не опубликованы Not published
Внутримышечно в дозе $1-5 \times 10^{10}$ вч для аденовектора и $4,4 \times 10^7-10^8$ ККИД₅₀ для MVA-BN-Filo, 1×10^8 БОЕ для MVA-EBO Z Intramuscularly, 1 to 5×10^{10} vp of adenovector, and 4.4×10^7 to 10^8 TCID₅₀ of MVA-BN-Filo virus, 1×10^8 PFU of MVA-EBO Z	Здоровые добровольцы из Великобритании и Сенегала Healthy volunteers from UK and Senegal	Вакцина cAd3-EBO Z безопасна и иммуногенна в испытанных дозах. Гуморальный иммунный ответ достигал максимума на 28 сутки после вакцинации во всех группах независимо от дозы вакцины. Для Т-клеточного иммунного ответа пик приходился на 14 день, наибольший ответ детектировался в группе, получившей максимальную дозу вакцины. Среди Т-клеток преобладали CD4⁺. В целом уровень иммунного ответа у людей на вакцину был ниже, чем у макак, ранее провакцинированных этой же вакциной. Введение буст-вакцины MVA-BN-Filo приводит к увеличению уровня иммунного ответа, в том числе к выработке CD8⁺Т-клеток. Вирус-специфические антитела детектировались спустя 6 месяцев после вакцинации, однако были достоверно выше в группе, получившей буст-вакцину [8] The cAd3-EBO Z vaccine is safe and immunogenic at the doses tested. Humoral immune response was maximal by day 28 following vaccination in all the groups, regardless of the vaccine dosage. T-cell immune response exhibited a peak on day 14, the highest response detected in the group administered a maximal vaccine dose. The CD4⁺ subset prevailed among T cells. In general, the level of immune response to the vaccine in humans was lower than in macaques that received the same vaccine. Introduction of a boost MVA-BN-Filo vaccine leads to increased level of immune response, including development of CD8⁺ T cells. Virus-specific antibodies were detected from 6 months post-vaccination, having been significantly higher in the group that received a boost vaccine [8]
Не уточняется Not specified	Здоровые добровольцы в Либерии Healthy volunteers from Liberia	Не опубликованы Not published

после первичной иммунизации у добровольцев, получивших Ad26.ZEBOV, детектировались IgG, специфические по отношению к гликопротеину вируса Эбола, а после буст-вакцинации MVA-BN-Filo наблюдался устойчивый подъем специфического иммунитета, который детектировался в течение 8 месяцев. В рандомизированных группах через 7 дней после буст-инъекции у 86% добровольцев детектировался специфический Т-клеточный иммунный ответ [16]. Для данного типа вакцин заявлены уже 3 и 4 фаза исследований, которые планируется проводить не только на здоровых добровольцах, но и людях с ВИЧ-инфекцией, пожилых людях, детях, в том числе рожденных у участников предыдущих этапов исследований. Планируется долгосрочное исследование в нескольких странах безопасности и наличия серьезных побочных эффектов, а также мониторинг исходов беременности после вакцинации данной вакциной. В Великобритании (University of Oxford) вакцина Ad26.ZEBOV будет изучена в различных схемах прайм-буст вакцинации совместно с вакциной на основе ChAd3 (ChAd3-EBO-Z).

Вакцины против вируса Эбола на основе ChAd3 составляют значительную долю заявленных в клинических испытаниях вакцин. Вакцина VRC-EBOADC069-00-VP или cAd3-EBO представляет собой смесь двух векторов на основе ChAd3 в соотношении 1:1, несущих гены гликопротеинов вируса Эбола штамм Заир и штамм Судан, а вакцина VRC-EBOADC076-00-VP или cAd3-EBOZ – вектор на основе ChAd3, несущий ген гликопротеина вируса Эбола штамм Заир. Серьезных побочных эффектов на введение вакцины cAd3-EBO не наблюдалось, при введении большей дозы (2×10^{11} ОЕ) у ряда добровольцев диагностировалась лихорадка. Гуморальный иммунный ответ и Т-клеточный иммунный ответ были более выражены в группе, получившей высокую дозу. При этом предсуществующий иммунитет к аденовирусу шимпанзе вызывал некоторое снижение уровня Т-клеточного CD8⁺ иммунного ответа у испытуемых, не оказывая влияния на гуморальный иммунный ответ и Т-клеточный CD4⁺ иммунный ответ. Согласно полученным результатам, количество антител у добровольцев к гликопротеину штамма Заир вируса Эбола находилось на уровне, обеспечивающем поствакцинальный защитный иммунитет у нечеловекоподобных приматов по данным ранних предклинических исследований [13]. Согласно предварительным данным, вакцина VRC-EBOADC076-00-VP (cAd3-EBOZ) также является безопасной и иммуногенной, а ее комбинация

с вакциной MVA-BN-Filo на основе модифицированного вируса осповакцины, содержащего антигены гликопротеинов (GP) штамма Таиланд, Заир, Судан и вируса Марбурга, может быть использована для формирования более длительного иммунного ответа [32].

Подобная же вакцина ChAd3-EBO-Z (GSK3390107A), производства GlaxoSmithKline, будет изучена как на взрослых добровольцах в качестве моновалентной вакцины, так и в комбинации с менингококковой вакциной (MENACWY-TT) в прайм-буст схемах на детях из Африки.

Клинические исследования вакцины cAd3-EBOZ, заявленные в Швейцарии (University of Lausanne Hospitals), продемонстрировали ее безопасность и иммуногенность. При этом единичная доза вакцины вызывает образование длительного гуморального иммунного ответа (до 6 месяцев). Стоит отметить, что в группах, получивших разные дозы вакцины, не наблюдалось значительных различий в безопасности и иммуногенности [6].

Проведенное в Великобритании изучение моновалентной вакцины на основе ChAd3 cAd3-EBO Z в различных дозах показало ее безопасность и иммуногенность. Однократная вакцинация индуцировала значительное увеличение титра антител к вирусу Эбола при всех дозах вакцины, иммунный ответ достигал максимума на 28 день после вакцинации, а пик уровня Т-клеточного иммунного ответа приходился на 14 день. Наибольший иммунный ответ детектировался в группе, получившей максимальную дозу вакцины. В целом уровень иммунного ответа у людей на вакцину был ниже, чем у ранее привитых этой же вакциной макаков. Введение в дальнейшем буст-вакцины MVA-BN-Filo приводит к усилению иммунных реакций, в том числе и Т-клеточного иммунного ответа (увеличивается популяция CD8⁺ клеток) [8]. Исследование данных вакцин в разных дозах и схемах введения продолжается. В последний год заявлен ряд клинических исследований, в которых будет оцениваться безопасность и иммуногенность вакцин на основе ChAd3 в прайм-буст схемах с вакциной MVA-EbolaZ (MVA-EBO Z) и вакциной MVA-BN-Filo.

В еще одном исследовании, проводимом в Либерии (PREVAIL), планируется изучить безопасность и иммуногенность двух вакцин: ChAd3-EBO Z на основе ChAd3 и VSVG-ZEBOV на основе вируса везикулярного стоматита в сравнении с одним и тем же контролем на большем количестве добровольцев, а также влияние предсуществу-

ющего иммунитета к аденовирусам шимпанзе на уровень иммуногенности вакцины [14].

Вакцины против туберкулеза (табл. 4)

Согласно заявленным клиническим испытаниям, для борьбы с туберкулезом в качестве вакцин исследуются вакцина на основе Ad5 и вакцина на основе Ad35. Вакцина на основе Ad5 Ad5Ag85A (McMaster University) представляет собой аденовирусный вектор, экспрессирующий иммунодоминантный антиген микобактерии туберкулеза Ag85A. В более раннем исследовании добровольцы, часть которых предварительно была провакцинирована БЦЖ, получали единичную внутримышечную инъекцию экспериментальной вакцины. Исследования показали безопасность и иммуногенность вакцины, а также продемонстрировали образование специфического Т-клеточного иммунного ответа, более значительного в группе, провакцинированной БЦЖ, несмотря на наличие предсуществующего иммунитета у добровольцев к Ad5 [27]. В более позднем исследовании доставлять вакцину в дыхательные пути предлагается с помощью небулайзера в виде аэрозоля. Результаты эксперимента не представлены.

Вакцина на основе Ad35 AERAS-402 (Aeras) представляет собой рекомбинантный аденовирус, репликативно-дефектный, экспрессирующий антигены микобактерии туберкулеза, кодирующие фьюжн-белки Ag85A, Ag85B и TB10.4. Изучение безопасности и иммуногенности данной вакцины на неинфицированных ВИЧ взрослых, получивших предварительно прививку БЦЖ, показало значительный полифункциональный Т-клеточный иммунный ответ (как CD4⁺, так и CD8⁺) [12], что свидетельствует о перспективности подобных вакцин. В ряде других исследований изучается безопасность и иммуногенность вакцины AERAS-402 в схемах гомологичной и гетерологичной (с БЦЖ) прайм-буст вакцинации у добровольцев с разным ВИЧ- и туберкулезным статусом (тест QuantiFERON®-TB Gold положительный либо отрицательный, но без признаков туберкулеза), а также у детей первого года жизни для оценки уровня их защиты от туберкулеза после вакцинации БЦЖ либо экспериментальной вакциной. Согласно полученным результатам, введение вакцины AERAS-402 не повлияло на вирусную нагрузку у ВИЧ-инфицированных добровольцев, при этом наблюдалась индукция полифункциональных Т-клеточных иммунных ответов. Пик CD4(+) Т-клеточного иммунного ответа пришелся на 14 день после второй вакцинации и затем снижался до 182 дня наблюдений [4].

У здоровых добровольцев из Кении несколько больше неблагоприятных поствакцинальных явлений наблюдалось в группе с положительным тестом QuantiFERON®-TB Gold. Окрашивание внутриклеточных цитокинов продемонстрировало скромный Т-клеточный иммунный ответ на Ag85A и Ag85B антигены и минимальный на TB10.4 антиген, не зависящий от статуса добровольцев по туберкулезу. Увеличение вируснейтрализующих антител к Ad35 наблюдалось у 50% испытуемых и было минимальным [33].

В клиническом исследовании, предложенном University of Oxford в сотрудничестве с Aeras и Crucell Holland BV, вакцина AERAS-402 на основе Ad35 вводится одно-, дву- либо трехкратно БЦЖ-вакцинированным здоровым добровольцам, которые затем получают единичную дозу вакцины MVA85A на основе модифицированного вируса осповакцины. Согласно полученным результатам, предлагаемая схема вакцинации безопасна и иммуногенна, а использование вируса осповакцины как буст-вакцины увеличивает специфический Т-клеточный иммунный ответ [25]. Стоит отметить, что иммунный ответ на вакцину был более продуктивным в группе, получившей 2 дозы аденовируса и 1 дозу вируса осповакцины.

Еще одно исследование, предложенное University of Oxford, предполагает использование в качестве вакцины против туберкулеза аденовирус шимпанзе ChAdOx1 85A. Добровольцы, получившие прививку БЦЖ, будут одно- или двукратно провакцинированы ChAdOx1 85A, а затем часть из них получит вакцину MVA85A на основе модифицированного вируса осповакцины. Результаты данного эксперимента не представлены.

Вакцины против гепатита (табл. 5)

В качестве экспериментальной вакцины против гепатита С предлагается использовать комбинацию аденовекторов Ad6NSmut и AdCh3NSmut (ReiThera Srl, Okairos) на основе Ad6 и ChAd3 соответственно, несущих антигены вируса гепатита С (NS-регион). Данные вакцины исследуются в разных схемах и разных режимах гомологичной прайм-буст вакцинации у здоровых и больных гепатитом С добровольцев с низким уровнем предсуществующего иммунитета к Ad6 и ChAd3, при этом часть больных гепатитом С добровольцев также получает противовирусную терапию (интерферон и рибавирин). У здоровых добровольцев введение вакцин вызывает качественный и устойчивый Т-клеточный иммунный ответ, который сохраняется в течение года. Как отмечается, вырабатываемые Т-клетки при этом были способны распознавать и гетерологичные штам-

ТАБЛИЦА 4. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ПРОТИВ ТУБЕРКУЛЕЗА

TABLE 4. VACCINES BASED ON ADENOVIRAL VECTORS AGAINST TUBERCULOSIS

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vector	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase	Дозы и методы введения Dose and methods of injection
Аденовирус человека 5 серотипа Human adenovirus serotype 5	Ad5Ag85A, McMaster University. Содержит иммунодоминантный антиген, кодирующий фьюжн-белок Ag85A микобактерии туберкулеза Ad5Ag85A, McMaster University. Contains an immunodominant saantigen encoding ausio protein Ag85A of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Фаза 1 Phase 1	Единичная внутримышечная инъекция в дозе 10^8 - 10^9 БОЕ либо введение в виде аэрозоля в дыхательные пути с помощью небулайзера в дозе 10^6 - 10^8 БОЕ Single intramuscular injection at a dose of 10^8 - 10^9 PFU, or aerosol inhalation to respiratory ways with Nebulizer at a dose of 10^6 - 10^8 PFU
Аденовирус человека 35 серотипа Human adenovirus serotype 35	AERAS-402, Aeras. Репликативно-дефектный Ad35, содержит антигены, кодирующие фьюжн-белки Ag85A, Ag85B и TB10.4 микобактерии туберкулеза AERAS-402, Aeras. Replication-deficient Ad35, contains antigens encoding fusion proteins Ag85A, Ag85B and TB10.4 of <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Фаза 2 Phase 2	2 или 3 внутримышечные инъекции в дозе $1,5 \times 10^{10}$ – 1×10^{11} вч 2 or 3 intramuscular injections at a dose of 1.5×10^{10} - 1×10^{11} viral particles
	AERAS-402, University of Oxford. Совместно с поксвирусом MVA85A, содержащим антиген Ag85A микобактерии туберкулеза AERAS-402, University of Oxford. Together with MVA85A poxvirus, containing Ag85A antigen of the <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Фаза 1 Phase 1	1, 2 или 3 внутримышечные инъекции в дозе 1×10^{11} вч с последующей единичной внутрикожной инъекцией поксвируса в дозе 1×10^8 БОЕ 1, 2 or 3 intramuscular injections at a dose of 1×10^{11} viral particles followed by a single intradermal injection of poxvirus at a dose of 1×10^8 PFU
Аденовирус шимпанзе, модифицированный изолят Y25 Shimpanzee adenovirus modified, isolate Y25	ChAdOx1 85A, University of Oxford. Как отдельно, так и совместно с MVA85A, оба вектора содержат антиген Ag85A микобактерии туберкулеза ChAdOx1 85A, University of Oxford. Both separately and together with MVA85A, both vectors contain Ag85A <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Фаза 1 Phase 1	1 или 2 внутримышечные инъекции в дозе 5×10^9 – $2,5 \times 10^{10}$ вч, затем часть испытуемых получит внутримышечную инъекцию поксвируса в дозе 1×10^8 БОЕ 1 or 2 intramuscular injections at a dose of 5×10^9 to 2.5×10^{10} viral particles, then a part of subjects will receive an intramuscular injection of poxvirus at a dose of 1×10^8 PFU

Параметры отбора добровольцев Eligibility criteria for volunteers	Результаты Results
Здоровые добровольцы, часть из которых предварительно вакцинирована БЦЖ Healthy volunteers, some of them previously vaccinated with BCG	Вакцина безопасна и иммуногенна. Вызывает образование специфического Т-клеточного иммунного ответа, более значительного в группе, провакцинированной БЦЖ [27] Vaccine is safe and immunogenic, induces production of specific T cell immune response, more expressed in BCG-vaccinated group [27]
Здоровые добровольцы, вакцинированные БЦЖ. Здоровые младенцы в возрасте 112-182 дней. Больные ВИЧ-1, вакцинированные БЦЖ. Здоровые добровольцы из Кении, ВИЧ-негативные, БЦЖ вакцинированные, без признаков туберкулеза, тест QuantiFERON®-TB Gold положительный или отрицательный Healthy volunteers vaccinated by BCG. Healthy infants at the age of 112-182 days. HIV-1-infected patients vaccinated by BCG. Healthy volunteers from Kenya, HIV-negative, BCG-vaccinated, tuberculosis-free, QuantiFERON®-TB Gold test positive or negative	Перспективная вакцина, способная значительно повысить уровень специфического Т-клеточного иммунного ответа у людей, предварительно вакцинированных БЦЖ [12]. Введение вакцины не влияло на вирусную нагрузку у ВИЧ-инфицированных добровольцев, при этом наблюдалась индукция полифункциональных Т-клеточных иммунных ответов [4]. У здоровых добровольцев из Кении наблюдался скромный Т-клеточный иммунный ответ на Ag85A и Ag85B антигены и минимальный на TB10.4 антиген, не зависящий от статуса добровольцев по туберкулезу (положительный или отрицательный). Увеличение вируснейтрализующих антител к Ad35 наблюдалось у 50% испытуемых и было минимальным [33] Prospective vaccine able to sufficiently increase levels of specific T cell immune response in humans previously vaccinated with BCG [12]. The vaccine injection did not affect viral burden in HIV-infected volunteers, and induction of polyfunctional T cell responses was observed [4]. In healthy volunteers from Kenya, a modest T cell response to Ag85A Ag85B and minimal reaction to TB10.4 antigen was revealed, independently on the volunteers TBC status (positive or negative). A minimal increase of virus-neutralizing Ad35 antibodies was observed in 50% of cases [33]
Здоровые добровольцы, вакцинированные БЦЖ Healthy volunteers vaccinated by BCG	Вакцина безопасна и иммуногенна. Использование поксвируса как буст-вакцины увеличивает специфический Т-клеточный иммунный ответ. Иммунный ответ был более продуктивным в группе, получившей 2 дозы аденовируса и 1 дозу поксвируса [25] Te vaccine is safe and immunogenic. Usage of poxvirus as a boost vaccine enhances a specific T cell immune response. Immune response was more productive in a group receiving 2 doses of adenovirus and 1 dose of poxvirus [25]
Здоровые добровольцы, вакцинированные БЦЖ Healthy volunteers, BCG-vaccinated	Не опубликованы Not published

ТАБЛИЦА 5. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ПРОТИВ ГЕПАТИТА

TABLE 5. VACCINES AGAINST HEPATITIS BASED ON ADENOVIRUS VECTORS

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vector	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 6 серотипа и аденовирус шимпанзе 3 серотипа Human adenovirus serotype 6 and chimpanzee adenovirus serotype 3	Ad6NSmut и AdCh3NSmut, ReiThera Srl. Содержат NS-регион вируса гепатита С с генетически инактивированным геном полимеразы Ad6NSmut and AdCh3NSmut, ReiThera Srl. Contain NS region of hepatitis C virus with genetically inactivated polymerase gene	Фаза 1 (HCV001 и HCV002) Phase 1 (HCV001 and HCV002)
Аденовирус человека 6 серотипа Human adenovirus serotype 6	Ad6NSmut, ReiThera Srl. Совместно с поксвирусом MVA-NSmut. Содержат NS-регион вируса гепатита С с генетически инактивированным геном полимеразы Ad6NSmut, ReiThera Srl. Together with MVA-NSmut poxvirus. Contain NS region of hepatitis C virus C with genetically inactivated polymerase gene	Фаза 1 (HCV004) Phase 1 (HCV004)
Аденовирус шимпанзе 3 серотипа Chimpanzee adenovirus serotype 3	AdCh3NSmut, ReiThera Srl. Совместно с поксвирусом MVA-NSmut. Содержат NS-регион вируса гепатита С с генетически инактивированным геном полимеразы AdCh3NSmut, ReiThera Srl. Together with MVA-NSmut poxvirus. Contain NS region of hepatitis C virus C with genetically inactivated polymerase gene	Фаза 1 Phase 1

мы вируса гепатита [2]. Результаты других экспериментов не представлены.

Еще одна стратегия вакцинации против вируса гепатита — использование аденовектора на основе Ad6 Ad6NSmut в схеме гетерологичной прайм-буст вакцинации совместно с модифицированным вирусом осповакцины MVA-NSmut на добровольцах с хроническим гепатитом С,

не имеющих предсуществующего иммунитета к Ad6. При этом, начиная с 10 недели, все испытуемые будут параллельно получать противовирусную интерферон-рибавирин терапию. Результаты данного эксперимента не опубликованы. На этой же стратегии основано исследование, в котором добровольцам будет вводиться AdCh3NSmut совместно с модифицированным

Дозы и методы введения Dose and methods of injection	Параметры отбора добровольцев Eligibility criteria for volunteers	Результаты Results
Прайм-буст схема, по 1 или 2 дозы аденовируса одного типа, затем 1 доза аденовируса другого типа. Дозы 5×10^8 – $7,5 \times 10^{10}$ вч для Ad6, 5×10^8 – $2,5 \times 10^{10}$ вч для ChAd3 Prime-boost schedule, 1 or 2 adenovirus doses of one type followed by 1 dose of adenovirus of other type. Doses: 5×10^8 to 7.5×10^{10} viral particles for Ad6; 5×10^8 to 2.5×10^{10} viral particles of ChAd3	Здоровые добровольцы без предсуществующего иммунитета к Ad6 и ChAd3. Другое исследование – больные хроническим гепатитом С, часть которых дополнительно получает противовирусную терапию (интерферон/рибавирин), без предсуществующего иммунитета к исследуемым аденовирусам Healthy volunteers without pre-existing immunity for Ad6 and ChAd3. Other study, patients with chronic hepatitis C, a part of them receive additional antiviral therapy (Interferon/ Ribavirin) without pre-existing immunity for the adenoviruses studied	Вакцина безопасна и иммуногенна. У здоровых добровольцев вызывает качественный и устойчивый Т-клеточный иммунный ответ, который сохраняется в течение года. При этом вырабатываемые Т-клетки были способны распознавать и гетерологичные подтипы вируса гепатита С [2] The vaccine is safe and immunogenic. In healthy volunteers, induces qualitative and stable T cell immune response persisting for a year. Meanwhile, the T cells generated were able to recognize heterologous hepatitis C subtypes [2]
Прайм-буст схема, 2 дозы Ad6NSmut, затем 2 дозы MVA-NSmut, противовирусная терапия (интерферон/рибавирин) начиная с 10 недели Prime-boost schedule, 2 doses of Ad6NSmut, then 2 doses of MVA-NSmut, antiviral therapy (Interferon/ Ribavirin) beginning from 10th week	Больные хроническим гепатитом С, без предсуществующего иммунитета к Ad6 Chronic hepatitis C patients without pre-existing immunity for Ad6	Не опубликованы Not published
Прайм-буст схема, 1 доза $2,5 \times 10^{10}$ вч аденовируса, затем 1 доза 2×10^6-10^8 БОЕ поксвируса. Часть испытуемых будут одновременно получать противовирусную (интерферон-рибавирин) терапию. Некоторые испытуемые получают вторые дозы аденовируса и поксвируса Prime-boost schedule, 1 dose of $2,5 \times 10^{10}$ adenoviral particles, then 1 dose 2×10^6-10^8 PFU of poxvirus, A part of subjects with in parallel receive, antiviral therapy (Interferon/ Ribavirin). Some subjects will receive second doses of adenovirus and poxvirus	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна и иммуногенна. Режим прайм-буст вакцинации позволяет получить качественный, полифункциональный и устойчивый Т-клеточный иммунный ответ против вируса гепатита С [29] The vaccine is safe and immunogenic. The prime-boost vaccination schedule allows to get a qualitative, polyfunctional and stable T cell immune response against hepatitis C virus [29]

вирусом осповакцины MVA-NSmut, несущим антигены NS3, NS4, NS5A и NS5B вируса гепатита С. Согласно результатам эксперимента по вакцинации здоровых добровольцев вакциной AdCh3NSmut в качестве прайм-вакцины и вакциной на основе вируса осповакцины MVA-NSmut в качестве буст-вакцины, был получен прочный, устойчивый и сбалансированный им-

мунный ответ (высокий уровень Т-клеточного ответа, как CD4⁺, так и CD8⁺). Была продемонстрирована наработка Т-клеток памяти и эффекторных Т-клеток, при этом после бустирования осповакциной популяция Т-клеток памяти значительно улучшала свое качество (увеличивались уровень их пролиферации и полифункциональность) [29]. Таким образом, все вышеиз-

ТАБЛИЦА 6. ВАКЦИНЫ НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ ПРОТИВ РЕСПИРАТОРНО-СИНЦИТИАЛЬНОГО ВИРУСА
TABLE 6. VACCINES AGAINST RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS BASED ON ADENOVIRAL VECTORS

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vector	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус шимпанзе 3 серотипа Chimpanzee adenovirus serotype 3	PanAd3-RSV, ReiThera Srl. Как отдельно, так и совместно с поксвирусом MVA-RSV. Содержат антигены, кодирующие белки F, N and M2-1 вируса RSV PanAd3-RSV, ReiThera Srl. Both separately and together with MVA-RSV poxvirus. Contain antigens encoding F, N and M2-1 proteins of RSV virus	Фаза 1 (RSV001) Phase 1 (RSV001)
Аденовирус человека 26 серотипа и аденовирус человека 35 серотипа Human adenovirus serotype 26 and human adenovirus serotype 35	Ad26.RSV.FA2 и Ad35.RSV.FA2, Crucell Holland BV. Содержат антиген, кодирующий белок F штамма A2 вируса RSV Ad26.RSV.FA2 and Ad35.RSV.FA2, Crucell Holland BV. Contain antigen encoding protein F of the A2 strain RS virus	Фаза 1 Phase 1

ложенное показывает высокую эффективность данного подхода для вакцинации людей против вируса гепатита С.

Вакцины против респираторно-синцициального вируса (RSV) (табл. 6)

Предложенное ReiThera Srl клиническое исследование — вакцинация вектором PanAd3-RSV на основе ChAd3 и вектором на основе вируса осповакцины MVA-RSV, несущими антигены F, N и M2-1 (кодируют фьюжн, нуклеокапсидный и матричный белки) вируса RSV, с использованием схемы гомологичной и гетерологичной прайм-буст вакцинации и разных доз и режимов

введения вакцин. Вакцины вводились испытуемым как внутримышечно, так и интраназально. Обе вакцины показали безопасность и хорошую переносимость, неблагоприятные побочные эффекты были незначительными. Введение вакцин вызывает образование гуморального и клеточного иммунного ответа, при этом Т-клеточный иммунный ответ более значителен при внутримышечном введении в качестве прайм-вакцины PanAd3-RSV, а в качестве буст-вакцины MVA-RSV. При внутримышечном способе введения вакцин титр образовавшихся вируснейтрализующих антител к аденовирусу шимпанзе был выше,

Дозы и методы введения Dose and methods of injection	Параметры отбора добровольцев Eligibility criteria for volunteers	Результаты Results
Гомологичные и гетерологичные прайм-буст схемы, внутримышечно либо интраназально, для аденовируса доза 5×10^9 – 5×10^{10} вч, для поксвируса 1×10^7 – 1×10^8 БОЕ Homologous and heterologous prime-boost schedules, either intramuscularly or intranasally, doses for adenovirus is 5×10^9 to 5×10^{10} viral particles; for poxvirus, 10^7 to 1×10^8 PFU	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Вакцина безопасна и иммуногенна. Вызывает образование как гуморального, так и клеточного иммунного ответа. Более значительный Т-клеточный иммунный ответ наблюдался при внутримышечном введении вакцин по схеме PanAd3-RSV/MVA-RSV. При внутримышечном способе введения вакцины титр образовавшихся вируснейтрализующих антител был выше, чем при интраназальном способе. Предсуществующий иммунный ответ к аденовирусу не оказывал влияния на иммуногенность вакцины [9]. Будет проведено изучение безопасности и иммуногенности вакцины у людей преклонного возраста (60-75 лет) [10] Vaccine is safe and immunogenic. Causes induction of both humoral and cellular immune response. A more expressed T cell immune response was observed for intramuscular vaccine injection of vaccines according to thePanAd3-RSV/MVA-RSV schedule. For intramuscular vaccine injection, the titer of virus-neutralizing antibodies was higher than with intranasal method, A pre-existing immune response to adenovirus did not exert effect upon immunogenicity [9]. A safety and immunogenicity study will be performed in elderly people (60-75 years old) [10]
Гомологичные и гетерологичные схемы прайм-буст вакцинации, внутримышечно, для Ad26 доза 5×10^{10} вч, для Ad35 1×10^{11} вч Homologous and heterologous boost-priming vaccination schedules, intramuscularly, For Ad26, dose is 5×10^{10} viral particles, for Ad35, 1×10^{11} viral particles	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Not published

чем при интраназальном способе введения. Стоит отметить, что предсуществующий иммунный ответ к аденовирусу не оказывал влияния на иммуногенность вакцины [9]. В дальнейшем планируется исследование безопасности и иммуногенности данных вакцин среди различных возрастных категорий добровольцев, в том числе пожилых людей 60-75 лет [10]. Также Crucell Holland BV в 2015 году заявила о клинических испытаниях вакцин против RSV на основе Ad35 и Ad26 (Ad35.RSV.FA2. и Ad26.RSV.FA2) в гомологичных и гетерологичных прайм-буст режимах вакцинации. Целью заявленных исследований является изуче-

ние безопасности и толерабельности вакцин при введении их здоровым добровольцам. Исследования в настоящий момент продолжаются.

Вакцина против сибирской язвы (табл. 7)

В 2013 году PaxVax Inc. заявила о клинических испытаниях вакцин против сибирской язвы на основе Ad4 в разных режимах прайм-буст вакцинации с вакциной AVA (BioThrax). Эта же вакцина (AVA, BioThrax) будет использоваться в качестве положительного контроля. Экспериментальные вакцины на основе репликативно-компетентных аденовекторов Ad4-PA (содержит протективный антиген) и Ad4-PA-GPI (содержит

ТАБЛИЦА 7. ВАКЦИНА НА ОСНОВЕ АДЕНОВИРУСНОГО ВЕКТОРА ПРОТИВ СИБИРСКОЙ ЯЗВЫ

TABLE 7. VACCINE AGAINST ANTHRAX BASED ON ADENOVIRAL VECTOR

Тип аденовирусного вектора Type of adenoviral vector	Вакцины и антигены Vaccines and antigens	Фаза клинических испытаний Clinical trial phase
Аденовирус человека 4 серотипа Human adenovirus serotype 4	Ad4-PA и Ad4-PA-GPI, PaxVax Inc. Репликативно-компетентные аденовирусные векторы, Ad4-PA содержит протективный антиген, а Ad4-PA-GPI содержит протективный антиген и гликозилфосфатидилинозитол Ad4-PA and Ad4-PA-GPI, PaxVax Inc. Replicative competent adenoviral vectors, Ad4-PA contains a protective antigen, whereas Ad4-PA-GPI contains a protective antigen and glycosyl phosphatidyl inositol	Фаза 1 Phase 1

протективный антиген и гликозилфосфатидилинозитол) предполагается вводить здоровым добровольцам перорально. Результаты данного исследования не представлены.

Заключение

В заключение хотелось бы отметить, что применение аденовекторов в качестве вакцин против различных инфекционных заболеваний является достаточно перспективным направлением современной медицины. Согласно многочисленным результатам клинических испытаний, аденовирусы в используемых для вакцинации дозах безопасны и не вызывают каких-либо значительных побочных эффектов. Их использование в схемах прайм-буст вакцинации, особенно гетеро-

логичной, приводит к выработке эффективного иммунного ответа, как гуморального, так и клеточного, что является существенным условием для борьбы с целым рядом вирусных и бактериальных инфекций, а проблему предсуществующего иммунитета к аденовекторам у человека можно решить, используя аденовирусы человека других серотипов и аденовирусы животных, либо схему гетерологичной прайм-буст вакцинации с ДНК-вакцинами или векторами на основе других вирусов. Таким образом, в недалеком будущем вакцины на основе аденовирусов могут весьма прочно занять свое место в профилактике и терапии ранее считавшихся неизлечимыми заболеваний.

Список литературы / References

1. Черенова Л.В., Каштиго Т.В., Саядян Х.С., Шмаров М.М. Разработка вакцин на основе аденовирусных векторов: обзор зарубежных клинических исследований (Часть 1) // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 2. С. 111-126. [Cherenova L.V., Kashtigo T.V., Saiadian K.S., Shmarov M.M. Development of vaccines based on adenoviral vectors: a review of foreign clinical studies (Part 1). *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 2, pp. 111-126. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-2-111-126.
2. Barnes E., Folgori A., Capone S., Swadling L., Aston S., Kurioka A., Meyer J., Huddart R., Smith K., Townsend R., Brown A., Antrobus R., Ammendola V., Naddeo M., O'Hara G., Willberg C., Harrison A., Grazioli F., Esposito M.L., Siani L., Traboni C., Oo Y., Adams D., Hill A., Colloca S., Nicosia A., Cortese R., Klenerman P. Novel adenovirus-based vaccines induce broad and sustained T cell responses to HCV in man. *Sci. Transl. Med.*, 2012, Vol. 4, no. 115, pp. 115ra1.
3. Chuang I., Sedegah M., Cicatelli S., Spring M., Polhemus M., Tamminga C., Patterson N., Guerrero M., Bennett J.W., McGrath S., Ganeshan H., Belmonte M., Farooq F., Abot E., Banania J.G., Huang J., Newcomer R.,

Дозы и методы введения Dose and methods of injection	Параметры отбора добровольцев Eligibility criteria for volunteers	Результаты Results
Перорально в дозах 10^9, 10^{10} и 10^{11} вч, прайм-буст схемы с вакциной AVA (Anthrax Vaccine Adsorbed, BioThrax). Вакцина AVA вводится внутримышечно с помощью инъекций, также используется как положительный контроль Orally at doses of 10^9, 10^{10} и 10^{11} viral particles, prime-boost schedules with AVA vaccine (Anthrax Vaccine Adsorbed, BioThrax), The AVA vaccine is injected intramuscularly, and is used as a positive control	Здоровые добровольцы Healthy volunteers	Не опубликованы Non published

Rein L., Litilit D., Richie N.O., Wood C., Murphy J., Sauerwein R., Hermesen C.C., McCoy A.J., Kamau E., Cummings J., Komisar J., Sutamihardja A., Shi M., Epstein J.E., Maiolatesi S., Tosh D., Limbach K., Angov E., Bergmann-Leitner E., Bruder J.T., Doolan D.L., King C.R., Carucci D., Dutta S., Soisson L., Diggs C., Hollingdale M.R., Ockenhouse C.F., Richie T.L. DNA prime/Adenovirus boost malaria vaccine encoding P. falciparum CSP and AMA1 induces sterile protection associated with cell-mediated immunity. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 2, doi: 10.1371/journal.pone.0055571

4. Churchyard G.J., Morgan C., Adams E., Hural J., Graham B.S., Moodie Z., Grove D., Gray G., Bekker L.-G., McElrath M.J., Tomaras G.D., Goepfert P., Kalams S., Baden L.R., Lally M., Dolin R., Blattner W., Kalichman A., Figueroa J.P., Pape J., Schechter M., Defawe O., De Rosa S.C., Montefiori D.C., Nabel G.J., Corey L., Keefer M.C. A phase IIA randomized clinical trial of a multiclade HIV-1 DNA prime followed by a multiclade rAd5 HIV-1 vaccine boost in healthy adults (HVTN204). *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 8, doi: 10.1371/journal.pone.0021225.

5. De Barra E., Hodgson S.H., Ewer K.J., Bliss C.M., Hennigan K., Collins A., Berrie E., Lawrie A.M., Gilbert S.C., Nicosia A., McConkey S.G., Hill A.V. A Phase Ia Study to Assess the Safety and Immunogenicity of New Malaria Vaccine Candidates ChAd63 CS Administered Alone and with MVA CS. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 12, doi: 10.1371/journal.pone.0115161.

6. De Santis O., Audran R., Pothin E., Warpelin-Decrausaz L., Vallotton L., Wuerzner G., Cochet C., Estoppey D., Steiner-Monard V., Lonchampt S., Thierry A.C., Mayor C., Bailer R.T., Mbaya O.T., Zhou Y., Ploquin A., Sullivan N.J., Graham B.S., Roman F., De Ryck I., Ballou W.R., Kieny M.P., Moorthy V., Spertini F., Genton B. Safety and immunogenicity of a chimpanzee adenovirus-vectored Ebola vaccine in healthy adults: a randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-finding, phase 1/2a study. *Lancet Infect. Dis.*, 2016, Vol. 16, no. 3, pp. 311-320.

7. Ewer K.J., O'Hara G.A., Duncan C.J., Collins K.A., Sheehy S.H., Reyes-Sandoval A., Goodman A.L., Edwards N.J., Elias S.C., Halstead F.D., Longley R.J., Rowland R., Poulton I.D., Draper S.J., Blagborough A.M., Berrie E., Moyle S., Williams N., Siani L., Folgori A., Colloca S., Sinden R.E., Lawrie A.M., Cortese R., Gilbert S.C., Nicosia A., Hill A.V. Protective CD8⁺ T-cell immunity to human malaria induced by chimpanzee adenovirus-MVA immunisation. *Nat. Commun.*, 2013, Vol. 4, p. 2836.

8. Ewer K., Rampling T., Venkatraman N., Bowyer G., Wright D., Lambe T., Imoukhuede E.B., Payne R., Fehling S.K., Strecker T., Biedenkopf N., Krähling V., Tully C.M., Edwards N.J., Bentley E.M., Samuel D., Labbé G., Jin J., Gibani M., Minhinick A., Wilkie M., Poulton I., Lella N., Roberts R., Hartnell F., Bliss C., Sierra-Davidson K., Powlson J., Berrie E., Tedder R., Roman F., De Ryck I., Nicosia A., Sullivan N.J., Stanley D.A., Mbaya O.T., Ledgerwood J.E., Schwartz R.M., Siani L., Colloca S., Folgori A., Di Marco S., Cortese R., Wright E., Becker S., Graham B.S., Koup R.A., Levine M.M., Volkmann A., Chaplin P., Pollard A.J., Draper S.J., Ballou W.R., Lawrie A., Gilbert S.C., Hill A.V. A Monovalent Chimpanzee Adenovirus Ebola Vaccine Boosted with MVA. *N. Engl. J. Med.*, 2016, Vol. 374, no. 17, pp. 1635-1646.

9. Green C.A., Scarselli E., Sande C.J., Thompson A.J., de Lara C.M., Taylor K.S., Haworth K., Del Sorbo M., Angus B., Siani L., Di Marco S., Traboni C., Folgori A., Colloca S., Capone S., Vitelli A., Cortese R., Klenerman P., Nicosia A., Pollard A.J. Chimpanzee adenovirus- and MVA-vectored respiratory syncytial virus vaccine is safe and immunogenic in adults. *Sci. Transl. Med.*, 2015, Vol. 7, no. 300, pp. 300ra126.
10. Green C.A., Scarselli E., Voysey M., Capone S., Vitelli A., Nicosia A., Cortese R., Thompson A.J., Sande C.S., de Lara C., Klenerman P., Pollard A.J. Safety and immunogenicity of novel respiratory syncytial virus (RSV) vaccines based on the RSV viral proteins F, N and M2-1 encoded by simian adenovirus (PanAd3-RSV) and MVA (MVA-RSV); protocol for an open-label, dose-escalation, single-centre, phase 1 clinical trial in healthy adults. *BMJ Open*, 2015, Vol. 5, no. 10, doi: bmjopen.bmj.com/content/5/10/e008748.
11. Gurwith M., Lock M., Taylor E.M., Ishioka G., Alexander J., Mayall T., Ervin J.E., Greenberg R.N., Strout C., Treanor J.J., Webby R., Wright P.F. Safety and immunogenicity of an oral, replicating adenovirus serotype 4 vector vaccine for H5N1 influenza: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 study. *Lancet Infect. Dis.*, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 238-250.
12. Hoft D.F., Blazevic A., Stanley J., Landry B., Sizemore D., Kpamegan E., Gearhart J., Scott A., Kik S., Pau M.G., Goudsmit J., McClain J.B., Sadoff J. A recombinant adenovirus expressing immunodominant TB antigens can significantly enhance BCG-induced human immunity. *Vaccine*, 2012, Vol. 30, no. 12, pp. 2098-2108.
13. Ledgerwood J.E., DeZure A.D., Stanley D.A., Novik L., Enama M.E., Berkowitz N.M., Hu Z., Joshi G., Ploquin A., Sitar S., Gordon I.J., Plummer S.A., Holman L.A., Hendel C.S., Yamshchikov G., Roman F., Nicosia A., Colloca S., Cortese R., Bailer R.T., Schwartz R.M., Roederer M., Mascola J.R., Koup R.A., Sullivan N.J., Graham B.S. Chimpanzee adenovirus vector Ebola vaccine – preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, 2014.
14. Ledgerwood J.E., Sullivan N.J., Graham B.S. Chimpanzee adenovirus vector Ebola vaccine--preliminary report. *N. Engl. J. Med.*, 2015, Vol. 373, no. 8, p. 776.
15. Liebowitz D., Lindbloom J.D., Brandl J.R., Garg S.J., Tucker S.N. High titre neutralising antibodies to influenza after oral tablet immunisation: a phase 1, randomised, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2015, Vol. 15, no. 9, pp. 1041-1048.
16. Milligan I.D., Gibani M.M., Sewell R., Clutterbuck E.A., Campbell D., Plested E., Nuthall E., Voysey M., Silva-Reyes L., McElrath M.J., De Rosa S.C., Frahm N., Cohen K.W., Shukarev G., Orzabal N., van Duijnhoven W., Truysers C., Bachmayer N., Splinter D., Samy N., Pau M.G., Schuitemaker H., Luhn K., Callendret B., Van Hoof J., Douoguih M., Ewer K., Angus B., Pollard A.J., Snape M.D. Safety and Immunogenicity of novel adenovirus type 26- and modified vaccinia Ankara-vectored Ebola vaccines: a randomized clinical trial. *JAMA*, 2016, Vol. 315, no. 15, pp. 1610-1623.
17. Ockenhouse C.F., Regules J., Tosh D., Cowden J., Kathcart A., Cummings J., Paolino K., Moon J., Komisar J., Kamau E., Oliver T., Chhoeu A., Murphy J., Lyke K., Laurens M., Birkett A., Lee C., Weltzin R., Wille-Reece U., Sedegah M., Hendriks J., Versteeg I., Pau M.G., Sadoff J., Vanloubbeeck Y., Lievens M., Heerwegh D., Moris P., Guerra Mendoza Y., Jongert E., Cohen J., Voss G., Ballou W.R., Vekemans J. Ad35.CS.01-RTS,S/AS01 heterologous prime boost vaccine efficacy against sporozoite challenge in healthy Malaria-Naïve adults. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 7, doi: [10.1371/journal.pone.0131571](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131571).
18. O'Hara G.A., Duncan C.J., Ewer K.J., Collins K.A., Elias S.C., Halstead F.D., Goodman A.L., Edwards N.J., Reyes-Sandoval A., Bird P., Rowland R., Sheehy S.H., Poulton I.D., Hutchings C., Todryk S., Andrews L., Folgori A., Berrie E., Moyle S., Nicosia A., Colloca S., Cortese R., Siani L., Lawrie A.M., Gilbert S.C., Hill A.V. Clinical assessment of a recombinant simian adenovirus ChAd63: a potent new vaccine vector. *J. Infect. Dis.*, 2012, Vol. 205, no. 5, pp. 772-781.
19. Ouédraogo A., Tiono A.B., Kargougou D., Yaro J.B., Ouédraogo E., Kaboré Y., Kangoye D., Bougouma E.C., Gansane A., Henri N., Diarra A., Sanon S., Soulama I., Konate A.T., Watson N.L., Brown V., Hendriks J., Pau M.G., Versteeg I., Wiesken E., Sadoff J., Nebie I., Sirima S.B. A phase 1b randomized, controlled, double-blinded dosage-escalation trial to evaluate the safety, reactogenicity and immunogenicity of an adenovirus type 35 based circumsporozoite malaria vaccine in Burkina Faso healthy adults 18 to 45 years of age. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, no. 11, doi: [10.1371/journal.pone.0078679](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078679).
20. Peters W., Brandl J.R., Lindbloom J.D., Martinez C.J., Scallan C.D., Trager G.R., Tingley D.W., Kabongo M.L., Tucker S.N. Oral administration of an adenovirus vector encoding both an avian influenza A hemagglutinin and a TLR3 ligand induces antigen specific granzyme B and IFN-gamma T cell responses in humans. *Vaccine*, 2013, Vol. 31, no. 13, pp. 1752-1758.
21. Schwartz L., Brown G.V., Genton B., Moorthy V.S. A review of malaria vaccine clinical projects based on the WHO rainbow table. *Malar. J.*, 2012, Vol. 11, p. 11.
22. Sedegah M., Tamminga C., McGrath S., House B., Ganeshan H., Lejano J., Abot E., Banania G.J., Sayo R., Farooq F., Belmonte M., Manohar N., Richie N.O., Wood C., Long C.A., Regis D., Williams F.T., Shi M., Chuang I.,

Spring M., Epstein J.E., Mendoza-Silveiras J., Limbach K., Patterson N.B., Bruder J.T., Doolan D.L., King C.R., Soisson L., Diggs C., Carucci D., Dutta S., Hollingdale M.R., Ockenhouse C.F., Richie T.L. Adenovirus 5-vectored P. falciparum vaccine expressing CSP and AMA1. Part A: safety and immunogenicity in seronegative adults. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 10, doi: 10.1371/journal.pone.0024586.

23. Sedegah M., Hollingdale M.R., Farooq F., Ganeshan H., Belmonte M., Kim Y., Peters B., Sette A., Huang J., McGrath S., Abot E., Limbach K., Shi M., Soisson L., Diggs C., Chuang I., Tamminga C., Epstein J.E., Villasante E., Richie T.L. Sterile immunity to malaria after DNA prime/adenovirus boost immunization is associated with effector memory CD8⁺T cells targeting AMA1 class I epitopes. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 9, doi: 10.1371/journal.pone.0106241.

24. Sedegah M., Hollingdale M.R., Farooq F., Ganeshan H., Belmonte M., Huang J., Abot E., Limbach K., Chuang I., Tamminga C., Epstein J.E., Villasante E. Controlled Human Malaria Infection (CHMI) differentially affects cell-mediated and antibody responses to CSP and AMA1 induced by adenovirus vaccines with and without DNA-priming. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2015, Vol. 11, no. 11, pp. 2705-2715.

25. Sheehan S., Harris S.A., Satti I., Hokey D.A., Dheenadhayalan V., Stockdale L., Manjaly Thomas Z.R., Minninnick A., Wilkie M., Vermaak S., Meyer J., O'Shea M.K., Pau M.G., Versteeg I., Douoguih M., Hendriks J., Sadoff J., Landry B., Moss P., McShane H. A Phase I, open-label trial, evaluating the safety and immunogenicity of candidate tuberculosis vaccines AERAS-402 and MVA85A, administered by prime-boost regime in BCG-vaccinated healthy adults. *PLoS One*, 2015, Vol. 10, no. 11, doi: 10.1371/journal.pone.0141687.

26. Sheehy S.H., Duncan C.J., Elias S.C., Biswas S., Collins K.A., O'Hara G.A., Halstead F.D., Ewer K.J., Mahungu T., Spencer A.J., Miura K., Poulton I.D., Dicks M.D., Edwards N.J., Berrie E., Moyle S., Colloca S., Cortese R., Gantlett K., Long C.A., Lawrie A.M., Gilbert S.C., Doherty T., Nicosia A., Hill A.V., Draper S.J. Phase Ia clinical evaluation of the safety and immunogenicity of the Plasmodium falciparum blood-stage antigen AMA1 in ChAd63 and MVA vaccine vectors. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, no. 2, doi: 10.1371/journal.pone.0031208.

27. Smaill F., Jeyanathan M., Smieja M., Medina M.F., Thantrige-Don N., Zganiacz A., Yin C., Heriazon A., Damjanovic D., Puri L., Hamid J., Xie F., Foley R., Bramson J., Gauldie J., Xing Z. A human type 5 adenovirus-based tuberculosis vaccine induces robust T cell responses in humans despite preexisting anti-adenovirus immunity. *Sci. Trans. Med.*, 2013, Vol. 5, no. 205, pp. 205ra134.

28. Sridhar S. Clinical development of Ebola vaccines. *Ther. Adv. Vaccines*, 2015, Vol. 3, no. 5-6, pp. 125-138.

29. Swadling L., Capone S., Antrobus R.D., Brown A., Richardson R., Newell E.W., Halliday J., Kelly C., Bowen D., Fergusson J., Kurioka A., Ammendola V., Del Sorbo M., Grazioli F., Esposito M.L., Siani L., Traboni C., Hill A., Colloca S., Davis M., Nicosia A., Cortese R., Folgori A., Klenerman P., Barnes E. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci. Transl. Med.*, 2014, Vol. 6, no. 261, pp. 261ra153.

30. Tamminga C., Sedegah M., Regis D., Chuang I., Epstein J.E., Spring M., Mendoza-Silveiras J., McGrath S., Maiolatesi S., Reyes S., Steinbeiss V., Fedders C., Smith K., House B., Ganeshan H., Lejano J., Abot E., Banania G.J., Sayo R., Farooq F., Belmonte M., Murphy J., Komisar J., Williams J., Shi M., Brambilla D., Manohar N., Richie N.O., Wood C., Limbach K., Patterson N.B., Bruder J.T., Doolan D.L., King C.R., Diggs C., Soisson L., Carucci D., Levine G., Dutta S., Hollingdale M.R., Ockenhouse C.F., Richie T.L. Adenovirus-5-vectored P. falciparum vaccine expressing CSP and AMA1. Part B: safety, immunogenicity and protective efficacy of the CSP component. *PLoS One*, 2011, Vol. 6, no. 10, doi: 10.1371/journal.pone.0025868.

31. Tamminga C., Sedegah M., Maiolatesi S., Fedders C., Reyes S., Reyes A., Vasquez C., Alcorta Y., Chuang I., Spring M., Kavanaugh M., Ganeshan H., Huang J., Belmonte M., Abot E., Belmonte A., Banania J., Farooq F., Murphy J., Komisar J., Richie N.O., Bennett J., Limbach K., Patterson N.B., Bruder J.T., Shi M., Miller E., Dutta S., Diggs C., Soisson L.A., Hollingdale M.R., Epstein J.E., Richie T.L. Human adenovirus 5-vectored Plasmodium falciparum NMRC-M3V-Ad-PfCA vaccine encoding CSP and AMA1 is safe, well-tolerated and immunogenic but does not protect against controlled human malaria infection. *Hum. Vaccin. Immunother.*, 2013, Vol. 9, no. 10, pp. 2165-2177.

32. Tapia M.D., Sow S.O., Lyke K.E., Haidara F.C., Diallo F., Doumbia M., Traore A., Coulibaly F., Kodio M., Onwuchekwa U., Sztein M.B., Wahid R., Campbell J.D., Kieny M.P., Moorthy V., Imoukhuede E.B., Rampling T., Roman F., De Ryck I., Bellamy A.R., Dally L., Mbaya O.T., Ploquin A., Zhou Y., Stanley D.A., Bailer R., Koup R.A., Roederer M., Ledgerwood J., Hill A.V., Ballou W.R., Sullivan N., Graham B., Levine M.M. Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: a phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet Infect. Dis.*, 2016, Vol. 16, no. 1, pp. 31-42.

33. Walsh D.S., Owira V., Polhemus M., Otieno L., Andagalu B., Ogotu B., Waitumbi J., Hawkrigide A., Shepherd B., Pau M.G., Sadoff J., Douoguih M., McClain J.B. Adenovirus type 35-vectored tuberculosis vaccine has

an acceptable safety and tolerability profile in healthy, BCG-vaccinated, QuantiFERON®-TB Gold (+) Kenyan adults without evidence of tuberculosis. *Vaccine*, 2016, Vol. 34, no. 21, pp. 2430-2436.

34. Zhang J. Advances and future challenges in recombinant adenoviral vectored h5n1 influenza vaccines. *Viruses*, 2012, Vol. 4, no. 11, pp. 2711-2735.

35. Zhu F.C., Hou L.H., Li J.X., Wu S.P., Liu P., Zhang G.R., Hu Y.M., Meng F.Y., Xu J.J., Tang R., Zhang J.L., Wang W.J., Duan L., Chu K., Liang Q., Hu J.L., Luo L., Zhu T., Wang J.Z., Chen W. Safety and immunogenicity of a novel recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in healthy adults in China: preliminary report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *Lancet*, 2015, Vol. 385, no. 9984, pp. 2272-2279.

Авторы:

Черенова Л.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной биотехнологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кашиго Т.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории клеточной микробиологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Саядян Х.С. — д.м.н., профессор, кафедра фармацевтической технологии и фармакологии ГБОУ ВПУ «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Шмаров М.М. — д.б.н., заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «Федеральный научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Cherenova L.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Biotechnology, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Kashtigo T.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Cellular Microbiology, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Saiadian Kh.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Pharmaceutical Technology and Pharmacology, First Moscow I. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Shmarov M.M., PhD, MD (Biology), Head, Laboratory of Molecular Biotechnology, N. Gamaleya Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

Поступила 14.09.2016
Отправлена на доработку 19.06.2017
Принята к печати 19.07.17

Received 14.09.2016
Revision received 19.06.2017
Accepted 19.07.2017

МОЛЕКУЛЯРНО-КЛЕТОЧНЫЕ МЕХАНИЗМЫ, ОПОСРЕДУЕМЫЕ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ, УЧАСТВУЮЩИЕ В ИНДУКЦИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ

Сенников С.В., Куликова Е.В., Кнауэр Н.Ю., Хантакова Ю.Н.

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

Резюме. Аутоиммунные заболевания и осложнения после трансплантационных операций являются серьезной проблемой здравоохранения, так как зачастую приводят к ухудшению качества жизни, снижению трудоспособности и инвалидизации населения. На сегодняшний день многообещающим методом терапии данных состояний является индукция антиген-специфической толерантности, в процессе формирования которой важное место занимают дендритные клетки. В данном обзоре проведен анализ современных данных по характеристике толерогенных дендритных клеток, по факторам, индуцирующим толерогенные свойства у дендритных клеток, по развитию центральной и периферической толерантности посредством дендритных клеток, по роли толерогенных дендритных клеток в формировании В-регуляторных клеток, а также по молекулярно-клеточным механизмам, которые принимают участие в формировании иммунологической толерантности, зависимой от толерогенных дендритных клеток. Толерогенные дендритные клетки играют ведущую роль в поддержании иммунного гомеостаза путем индукции иммунологической толерантности, механизмы которой связаны с генерацией Т-регуляторных клеток, индукцией анергии или апоптоза Т-клеток. Формирование толерогенных свойств у дендритных клеток происходит под влиянием различных факторов, регулирующих созревание и дифференцировку дендритных клеток и индуцирующих синтез ими противовоспалительных агентов. Благодаря своей способности индуцировать натуральные и периферические Т-регуляторные клетки, дендритные клетки вносят свой вклад в развитие центральной и периферической толерантности в организме. Анализ результатов экспериментальных работ свидетельствует о том, что помимо индукции Т-регуляторных клеток толерогенные дендритные клетки принимают участие в генерации В-регуляторных клеток, которые играют не последнюю роль в формировании толерантности и имеют способность влиять на популяцию Т-регуляторных клеток. Однако механизмы, которые приводят к формированию популяции В-регуляторных клеток под действием толерогенных дендритных клеток, не вполне установлены. Обзор литературных данных показал, что молекулярно-клеточные механизмы индукции иммунологической толерантности посредством толерогенных дендритных клеток и других субпопуляций регуляторных клеток, взаимодействующих друг с другом, во многом схожи. На сегодняшний день роль толерогенных дендритных клеток в поддержании иммунологической толерантности в целом определена, однако некоторые аспекты требуют более глубокого изучения. Последующие экспериментальные исследования приведут к лучшему пониманию механизмов сигнализации и реализации иммунологических функций толерогенных дендритных

Адрес для переписки:

Сенников Сергей Витальевич
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт
фундаментальной и клинической иммунологии»
630099, Россия, г. Новосибирск, ул. Ядринцевская,
14, ком. 301-309.
Тел.: 8 (383) 222-19-10.
Факс: 8 (383) 222-70-28.
E-mail: sennikovsv@gmail.com

Address for correspondence:

Sennikov Sergey V.
Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology
630099, Russian Federation, Novosibirsk,
Yandrintsevskaya str., 14, room 301-309.
Phone: 7 (383) 222-19-10.
Fax: 7 (383) 222-70-28.
E-mail: sennikovsv@gmail.com

Образец цитирования:

С.В. Сенников, Е.В. Куликова, Н.Ю. Кнауэр,
Ю.Н. Хантакова «Молекулярно-клеточные механизмы,
опосредуемые дендритными клетками, участвующие
в индукции толерантности» // Медицинская иммунология,
2017. Т. 19, № 4. С. 359-374.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-359-374

© Сенников С.В. и соавт., 2017

For citation:

S.V. Sennikov, E.V. Kulikova, N.Yu. Knauer, Yu.N. Khantakova
“Molecular and cellular mechanisms mediated by dendritic cells
involved in the induction of tolerance”, Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4,
pp. 359-374. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-359-374

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-359-374

клеток, что предоставит дополнительную информацию для разработки подходов применения толерогенных дендритных клеток для контроля аутоиммунных заболеваний и трансплантационных осложнений.

Ключевые слова: толерогенные дендритные клетки, иммунологическая толерантность, центральная толерантность, периферическая толерантность, Т-регуляторные клетки, В-регуляторные клетки

MOLECULAR AND CELLULAR MECHANISMS MEDIATED BY DENDRITIC CELLS INVOLVED IN THE INDUCTION OF TOLERANCE

Sennikov S.V., Kulikova E.V., Knauer N.Yu., Khantakova Yu.N.

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

Abstract. Autoimmune diseases and complications after transplantation operations are major public health problem, as they often lead to deterioration in the quality of life, reduce work capacity and disability in the population. To date, the induction of antigen-specific tolerance is the promising method of therapy. During this process dendritic cells play important role. In this review current data of tolerogenic dendritic cells characterization, of factors inducing tolerogenic properties in dendritic cells, development of central and peripheral tolerance by dendritic cells, role of tolerogenic dendritic cells in the formation of regulatory B cells, molecular and cellular mechanisms that are involved in the formation of an immunological tolerance depending on tolerogenic dendritic cells were analyzed. Tolerogenic dendritic cells play a key role in maintaining of immune homeostasis by inducing immunological tolerance mechanisms which are associated with the generation of regulatory T cells, induction of anergy or apoptosis of T cells. Formation of tolerogenic properties in dendritic cells is occurred by various factors that regulate the maturation and differentiation of dendritic cells and induce anti-inflammatory agents synthesis of them. Because of their ability to induce natural and peripheral regulatory T cells, dendritic cells contribute to the development of the central and peripheral tolerance in the organism. Analysis of the results of experimental work demonstrates that in addition to induction of regulatory T cells tolerogenic dendritic cells participate in generating of regulatory B cells that play a role in the formation of tolerance and have the ability to affect the population of regulatory T cells. However, the mechanisms that lead to the formation of B cell population by tolerogenic dendritic cells have not been completely established yet. Review of published data showed that the molecular and cellular mechanisms of immunological tolerance induction by tolerogenic dendritic cells and other regulatory cell subpopulations interacting with each other are similar to a large extent. Currently, the role of tolerogenic dendritic cells in maintaining of immune tolerance is determined generally, however, some aspects require further investigation. Subsequent experimental studies will lead to a better understanding of the signaling mechanisms and the realization of immunological functions of tolerogenic dendritic cells, which provide additional information for application approaches development of tolerogenic dendritic cells for the control of autoimmune diseases and transplant complications.

Keywords: tolerogenic dendritic cells, immunological tolerance, central tolerance, peripheral tolerance, regulatory T cells, regulatory B cells

Работа поддержана РФФИ. Соглашение № 16-15-00086 от 11.01.2016.

Введение

Перспективным направлением в терапии аутоиммунных состояний и трансплантационных осложнений является индукция антиген-специфической толерантности. Применяемая в данный момент при аутоиммунных заболеваниях и трансплантации общая иммуносупрессия под действием фармакологических препаратов является высокоэффективной для предотвращения прогрессирования заболевания и реакции

отторжения, но приводит к серьезным осложнениям. Такое воздействие на организм оказывает неспецифическую токсичность и при длительном применении приводит к развитию онкологических и инфекционных заболеваний [96].

В настоящее время в качестве наиболее эффективного подхода для индукции антиген-специфической толерантности рассматривают возможность формирования толерантности к антигенам гистосовместимости донора или реципиента, или к собственным антигенам. Ключевыми клетками в распознавании и представлении антигена являются дендритные клетки (ДК), которые при определенном воздействии могут

направлять антиген-специфическую иммунную реакцию как по гиперэргическому, так и анэргическому пути [6, 70]. Кроме того, данные клетки связывают врожденный и адаптивный иммунитет и согласуют ответы различных типов клеток [35]. За последнее десятилетие стало ясно, что, помимо их роли в праймировании эффекторных Т-клеточных ответов против вторжения патогенных микроорганизмов, ДК играют решающую роль в развитии ауто толерантности и являются привлекательной мишенью для иммунотерапии [74]. Эти разнонаправленные функции ДК контролируются посредством регуляции созревания ДК, что имеет решающее значение для поддержания иммунного гомеостаза. В данном обзоре обсуждаются механизмы, которые приводят к образованию толДК, механизмы, через которые толДК модулируют Т- и В-клеточные популяции, осуществляя контроль центральной и периферической толерантности, супрессивные механизмы, которые уравнивают активирующие сигналы клеток иммунной системы для сохранения периферической толерантности и лежат в основе новых методов иммунотерапии при аутоиммунных заболеваниях и трансплантационных осложнениях.

Краткая характеристика толерогенных дендритных клеток

Дендритные клетки являются профессиональными антигенпрезентирующими клетками и представляют собой достаточно разнородную популяцию клеток как по направленности дифференцировки, так и по функциональной активности. Исходя из того, к какому результату приводит активность ДК, условно их можно разделять на иммуногенные и толерогенные ДК. Толерогенные ДК (толДК) описывают как ДК, подавляющие иммунный ответ, причем внутри этой группы также есть определенная гетерогенность. В частности, можно выделять такие классы, как незрелые ДК с толерогенной активностью и «модулированные» ДК, приобретающие толерогенные свойства в результате дополнительной стимуляции [1, 62].

Незрелые ДК обладают свойством индукции анергии и, следовательно, выступают как клетки с толерогенной активностью. Их статус связан с недостаточной экспрессией костимуляторных молекул и молекул МНС II. В то же время для этих клеток характерна более высокая экспрессия PRRs (pathogen recognizing receptors), в частности TLR (toll-like receptors), RLRs (retinoic-acid-inducible gen I (RIG-I)-like receptors), NLRs (nucleic-binding oligomerization domain (NOD) — like receptors), Fcγ-рецепторов, рецепторов комплемента, скавенджер-рецепторов и рецепторов к фосфатидилсерину. Показано, что аллогенные

Т-клетки, культивируемые с незрелыми ДК, могут приобретать рефрактерность к антигенным стимулам, в том числе полученным от зрелых ДК [80].

Другой важный класс толДК — это толДК, полученные в результате какого-либо дополнительного модулирующего воздействия. Эти клетки также характеризуются сниженной экспрессией костимуляторных/коактиваторных молекул, высоким уровнем продукции противовоспалительных цитокинов (главным образом IL-10) и пониженным — провоспалительных цитокинов, а также способностью индуцировать снижение Т-клеточного ответа и генерацию Т-регуляторных клеток.

Существуют и прочие типы ДК с толерогенной активностью. Например, в коже человека описаны CD141⁺ дермальные ДК, частично сохраняющие фенотип незрелой ДК (CD83⁺CD80⁺CD86⁺), также характеризующиеся экспрессией IL-10 и способностью к индукции толерантности. В слизистых оболочках описаны ДК, несущие маркер CD103 и обладающие регуляторной активностью за счет генерации Treg, секреции ретиноевой кислоты, TGF-β и IDO.

Вне зависимости от способа возникновения, толДК играют чрезвычайно важную роль в поддержании иммунного гомеостаза путем индукции иммунологической толерантности, механизмы которой связаны с генерацией Т-регуляторных клеток, ингибированием Т-клеточного ответа и индукцией апоптоза Т-клеток.

Факторы, приводящие к толерогенным свойствам дендритных клеток

Толерогенная активность ДК зависит от степени зрелости и может быть связана с воздействием целого ряда факторов: тканевое микроокружение, патогены микроорганизмов, стимулы от других клеток и т.д. [57]. В итоге толДК не теряют способности к презентации антигена (АГ), но характеризуются снижением экспрессии костимуляторных молекул (CD40, CD80, CD83) и провоспалительных цитокинов (IL-12), повышением экспрессии ингибиторных молекул (PDL1, CD95L, IDO) и противовоспалительных цитокинов (TGF-β, IL-10), а также устойчивостью к воздействию сигналов к созреванию [68].

Активация паттерн-распознающих рецепторов (PRRs) на ДК патогенными микроорганизмами обычно приводит к индукции воспалительного ответа [57]. Однако ряд микробных продуктов, напротив, способствует развитию толерантности. Так, зимозан дрожжевых грибов, продукты *Y. pestis*, *Schistosoma mansoni*, *Bordetella pertussis*, связывающиеся с TLR2, TLR4 или TLR6, продукты *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*, *Mycobacterium*, *H. pylori*, связывающиеся с DC-

SIGN, способны индуцировать регуляторную активность ДК, связанную с индукцией Treg и подавлением Т-клеточной активации. Вероятно, с этим может быть связана возможность ухода от иммунного контроля, однако требуется детальное исследование точных механизмов.

Клетки, формирующие микроокружение ДК, способны создавать условия для генерации ДК с регуляторной активностью [57]. Такого рода активность показана, в частности, для стромы селезенки, легких и печени, а также для опухолевого микроокружения [57]. Секретция стромальными клетками TGF- β и макрофагального колониестимулирующего фактора M-CSF приводит к генерации CD11b^{high}Id^{low} ДК, обладающих регуляторной активностью. Этот тип ДК способен подавлять пролиферацию Т-клеток за счет секреции NO или PGE₂.

Слизистая оболочка кишки может рассматриваться в качестве особого варианта тканевого микроокружения за счет наличия множества факторов, выделяемых собственными клетками организма, бактериями, населяющими ЖКТ, а также поступающих с пищей. Факторы, выделяемые кишечными эпителиоцитами (TSLP, ретиноевая кислота, TGF- β , IL-25) индуцируют толерогенные свойства ДК за счет снижения продукции ими IL-12 и IL-23 и повышения продукции IL-10, приводя к подавлению генерации Th1 клеток и индукции генерации Treg [44, 58].

Вещества, поступающие в организм извне, также могут модулировать активность ДК, при этом эффекты могут быть прямо противоположными. CD103⁺ ДК кишечной слизистой, обладающие толерогенной активностью, экспрессируют на своей поверхности рецептор ароматических углеводородов AhR (aryl hydrocarbon receptor), лигандами которого являются такие ксенобиотики, как бензпирен, диоксины, индол-3-карбинол и его производное, образующееся в ЖКТ в кислых условиях, 3,3 -дииндолилметан (DIM). При использовании таких лигандов AhR, как метиловый эфир 2-(1-Н-индол-3-карбонил)-тиазол-4-овой кислоты (ITE) или VAF347, отмечался положительный эффект на индукцию толерогенных ДК [73]. В то же время другие лиганды, например 3,3 -дииндолилметан (DIM), обладают ингибиторной активностью по отношению к толДК. В эксперименте *in vitro* было показано, что DIM не только ингибирует образование CD11⁺CD103⁺ ДК из клеток костного мозга, но и подавляет экспрессию молекул, связанных с дифференцировкой и функционированием ДК — IDO, транскрипционных факторов Id2 и E2-2. Однако при этом экспрессия TGF- β значимо не менялась. Отмечалось также снижение уровня фосфорилирования белков STAT3

и STAT5, важных участников сигнальных путей, регулирующих дифференцировку ДК [51].

В определенных условиях значимым компонентом окружения ДК могут стать апоптотические клетки. Их распознавание и поглощение может приводить к подавлению презентации АГ и созревания ДК, путем снижения экспрессии костимуляторной молекулы CD86 и IL-12, а также индукции секреции TGF- β и IL-10 [82, 91].

Немаловажным фактором индукции и поддержания толерогенных свойств ДК является контакт с Treg. При делеции Treg отмечалось увеличение числа ДК усиление экспрессии поверхностных маркеров CD40, CD80, CD86 [74]. При этом известно, что для подавления активации ДК Т-регуляторными клетками необходимо наличие прямого взаимодействия TCR и молекул МНС II.

Описано несколько механизмов, благодаря которым Treg способны воздействовать на ДК. Экспрессируемые Т-регуляторными клетками молекулы CTLA-4 и LAG3, взаимодействующие с поверхностными маркерами ДК, приводят к подавлению активации ДК. Так, воздействие CTLA-4 приводит к снижению экспрессии молекул CD80, CD86, стимуляции секреции IDO. LAG3, взаимодействуя с молекулами МНС II на поверхности ДК, также подавляет активацию ДК через вовлечение ингибиторных сигнальных путей. Другой механизм связан с прямым цитотоксическим действием Treg на ДК с участием перфорин-зависимых механизмов. Кроме того, Т-регуляторные клетки секретируют цитокины с иммуносупрессорной активностью (TGF- β), подавляющие активацию ДК.

В настоящее время известно, что Т-регуляторные клетки способны модулировать уровень цитоплазматического цАМФ путем изменения количества перичеселлюлярного аденозина. Повышение уровня цитоплазматического цАМФ в ДК приводит к подавлению их активации. Более того, Т-регуляторные клетки, характеризующиеся конститутивно высоким уровнем цАМФ в цитоплазме, способны к прямому переносу этих молекул ДК через щелевидные контакты [57].

В поддержании толерогенных свойств ДК могут принимать участие и другие иммунокомпетентные клетки. Инвариантные НКТ-клетки (iNKT) индуцируют образование толДК, секретирующих IL-10 и участвующих в генерации Treg, что в конечном итоге может предотвращать развитие аутоиммунного процесса [57]. Протолерогенный эффект iNKT-клеток осуществляется за счет связывания CD1d и последующей продукции противовоспалительных цитокинов (IL-10). Следует отметить, что iNKT-клетки способны индуцировать и развитие иммуногенных ДК, их

эффект будет зависеть от той стадии созревания, на которой находится ДК в момент контакта [18].

Говоря о регуляции иммунологической активности ДК, нельзя не упомянуть и об эпигенетической регуляции, в частности об ацетилировании гистонов. Было показано, что ингибирование гистоновых деацетилаз такими агентами, как вальпроат натрия и MS-275, приводит к снижению экспрессии CD1a, маркеров, связанных с стимуляцией и клеточной адгезией (CD40, CD80, CD83), уменьшению миграционной способности ДК и их аллостимуляторной активности, снижению секреции провоспалительных цитокинов (TNF α , IL-6, IL-12) [57, 69].

Другим фактором эпигенетической регуляции является действие некодирующих РНК, в частности микроРНК (miRNA) и длинных некодирующих РНК (lncRNA) [57]. В настоящее время известно о вкладе таких miRNA, как miR-155, miR-27, miR-148/152a, miR-22, miR-146a, в созревание и дифференцировку ДК. Показано, что регуляторные ДК характеризуются повышенной экспрессией микроРНК miR-30b, которая связана с усилением продукции IL-10 и NO через Notch1-сигнальный путь [83].

Длинные некодирующие РНК, как было обнаружено, также связаны с регуляцией созревания и активации ДК, модулируя экспрессию генов и трансляцию мРНК, связываясь с малыми РНК и РНК-связывающими белками [92].

Формирование толерогенных свойств у дендритных клеток связано с влиянием разнообразных факторов, механизмы действия которых сводятся к регуляции созревания и дифференцировки ДК и к индукции синтеза ими противовоспалительных агентов.

Развитие центральной и периферической толерантности посредством дендритных клеток, характеристика и формирование Т-регуляторных клеток

Иммунологическая толерантность подразделяется на центральную и периферическую, и в каждую из них толерогенные ДК вносят свой вклад.

Центральная толерантность в решающей степени зависит от тимусных АПК, в том числе от корковых эпителиальных клеток тимуса (сTECs) и эпителиальных клеток мозгового слоя тимуса (mTECs). сTECs играют важную роль в позитивной селекции тимоцитов, но они могут также проводить отрицательный отбор тимоцитов с высокой аутореактивностью, а также способны поддерживать дифференцировку Т-регуляторных клеток [70]. Аналогичным образом mTECs отрицательно отбирают тимоциты с высокой аутореактивностью, а также опосредуют положительную селекцию Т-регуляторных клеток. mTECs уникальны тем, что экспресси-

руют фактор транскрипции AIRE (Autoimmune Regulator), который обуславливает транскрипцию широкого диапазона тканеспецифических генов, экспрессирующихся только в периферических тканях. Соответственно, широкий спектр тканеспецифических антигенов экспрессируется и представляется в mTECs, и эта презентация опосредует негативный отбор и дифференцировку Treg из тимоцитов, специфических для тканеспецифических антигенов. Тем не менее не каждый тканеспецифический антиген экспрессируется в mTECs [60], и даже некоторые среди экспрессирующихся не эффективно представляются на mTECs [49]. Таким образом, вероятно, существуют дополнительные механизмы, которые играют роль в формировании центральной толерантности.

Таким механизмом поддержания толерантности является участие тимусных дендритных клеток. В дополнение к корковым и мозговым эпителиальным клеткам тимуса, дендритные клетки занимают важную часть тимусных АПК. Известно, что презентация антигена в комплексе с МНСII на АПК, имеющих костномозговое происхождение, играет важную роль в негативной селекции. Недавно было показано, что у мышей, имеющих дефицит МНСII в ДК, возникает накопление CD4⁺ тимоцитов [56]. Также, по другим данным, мыши с малым количеством ДК показали значительное увеличение числа CD4⁺ тимоцитов [71], что свидетельствует о важной роли ДК в отрицательной селекции CD4⁺ тимоцитов. Роль ДК в делеции CD8⁺Т-клеток менее понятна. Абляция гена МНСI в АПК, полученных из костного мозга, приводит к некоторому увеличению количества CD8⁺ тимоцитов [87], однако удаление ДК не дает такого эффекта [71].

Роль тимусных ДК в развитии Treg-клеток несомненна, однако до сих пор обсуждается необходимость их присутствия в данном процессе. Мыши, дефицитные по ДК с рождения или во взрослом состоянии, имели количество Treg, сопоставимое с количеством у мышей с достаточным количеством ДК [27, 71]. Мыши, имеющие дефицит по МНСII в АПК, полученных из клеток костного мозга, или ДК, также имели нормальное количество Т-регуляторных клеток [7, 56]. Эти данные привели к утверждению, что ДК не являются необходимыми для развития Treg. Однако оно не согласуется с тем фактом, что ДК способны позитивно отбирать Treg, специфичные к антигенам, которые они представляют.

Механизмы, приводящие к формированию Treg из тимоцитов, широко исследованы. Во-первых, для этого тимоциты должны получить сигнал через TCR [46], а также через костимуляторные рецепторы CD28 [2, 78] и рецепторы

суперсемейства фактора некроза опухоли [61]. Кроме того, они нуждаются в сигнализации от γ -цепи рецепторов таких цитокинов, как IL-2, IL-15 и IL-7 [33, 55].

Ранние исследования показали, что тимусный стромальный лимфопоэтин (TSLP) опосредует созревание тимусных ДК, что играет важную роль в развитии Treg [94]. TSLP у человека экспрессируется в тельцах Гассалья, группе эпителиальных клеток в мозговом слое тимуса. Обработка тимусных ДК человека TSLP приводит к усилению экспрессии костимуляторных молекул CD80 и CD86 и такие ДК способны индуцировать дифференцировку Treg. По последним данным, плазмацитоидные ДК человека также экспрессируют рецептор для TSLP после активации и отвечают на его присутствие экспрессией высоких уровней CD80 и CD86, и эффективной индукцией Treg *in vitro* [40]. Эти исследования подтверждают, что TSLP опосредует созревание тимусных ДК путем усиления экспрессии костимуляторных молекул, которые способствуют дифференцировке Treg. Тем не менее, роль TSLP в формировании Treg *in vivo* не была установлена. У мышей, дефицитных по рецептору TSLP, наблюдается нормальное количество Treg в тимусе [65], что может говорить о том, что передача сигналов от TSLP не является существенной для развития Treg, по крайней мере у мышей.

Еще одним кандидатом на роль в образовании Treg является CD70 на ДК [25]. CD70 является членом суперсемейства TNF и экспрессируется в mTECs и тимусных ДК, и его рецептор CD27 экспрессируется в тимоцитах. Генетическая абляция CD70 или CD27 уменьшает количество Treg в тимусе, в то время как посредством передачи сигнала через CD27 развивающиеся Treg избегают апоптоза. Кроме того, CD70 на CD8⁺ ДК способствует дифференцировке Treg *in vitro*. Эти данные позволяют предположить, что взаимодействие ДК с тимоцитами через CD70-CD27 играет существенную роль в развитии Treg. За последнее время появились данные, согласно которым другие члены суперсемейства TNF, такие как GITR, TNF, и OX40L вносят свой вклад в развитие Treg [61]. Эти молекулы экспрессируются в mTECs и/или тимусных ДК и связываются с соответствующими рецепторами на предшественниках Т-регуляторных клеток, что повышает способность последних конкурировать за ограниченное количество IL-2 и пополнять пул Treg в тимусе.

Участие ДК в формировании периферической толерантности также показано во многих исследованиях. Так, доставка антигена ДК при отсутствии воспалительных сигналов приводит к транзентной активации и пролиферации антиген-специфических CD4⁺ и CD8⁺ Т-клеток

с последующим удалением этих Т-клеток и созданием антиген-специфической Т-клеточной толерантности [14, 41]. Одним из важных механизмов индукции такой Т-клеточной периферической толерантности с помощью ДК является отрицательная костимуляция через ингибирующие рецепторы клеточной поверхности семейства CD28, в числе которых PD1 и CTLA-4. Как было установлено, костимуляторные лиганды CD80 и CD86, которые взаимодействуют с CTLA4, а также лиганды PD-L1 и PD-L2, связывающиеся с PD1, экспрессируются на сравнительно более высоком уровне на активированных ДК, чем на ДК при отсутствии воспалительных сигналов [99]. Таким образом, несмотря на важное значение связывания PD1 и CTLA4 на Т-клетках для индукции толерантности с помощью ДК, уровень экспрессии их лигандов на ДК не влияет на сдвиг иммунной системы в сторону толерантности или в сторону возникновения иммунных реакций.

Другой механизм индукции Т-клеточной периферической толерантности ДК вовлекает фермент катаболизма триптофана IDO (indoleamine 2,3-dioxygenase), который экспрессируется ДК. IDO, продуцируемый ДК, способствует Т-клеточной толерантности не только через механизмы, которые зависят от каталитической функции IDO, такие как местное истощение триптофана и продукция кинуренина [10, 66], но также через независимые от каталитической активности сигнальные пути, в которых задействован IDO [72]. Вместе взятые эти механизмы индукции внутренней Т-клеточной периферической толерантности позволяют ДК очищать репертуар наивных Т-клеток антиген-специфическим способом от аутореактивных Т-клеток, которые избежали отрицательной селекции в тимусе.

Помимо роли в формировании Т-клеточной периферической толерантности, ДК являются важным звеном в основной периферической толерантности, которая связана с функцией CD4⁺FoxP3⁺ регуляторных Т-клеток. При этом ДК не только стимулируют образование новых Т-регуляторных клеток, но и модулируют активность уже имеющихся. Хотя, как уже было описано выше, развитие Treg в тимусе у мышей не затрагивается при недостатке ДК [12], поддержание нормального числа Treg на периферии действительно зависит от связывания Т-клеточного рецептора (TCR) и костимуляции по CD80 и CD86, которые экспрессируются на ДК [9, 27]. Кроме того, было обнаружено, что гомеостатическая пролиферация, которая быстро пополняет пул Treg после истощения FoxP3⁺ клеток, зависит от наличия ДК, помимо сигнального пути с уча-

ствием интерлейкина-2 (IL-2) [84]. В дополнение к этому ДК могут индуцировать дифференцировку наивных $CD4^+$ T-клеток *de novo* в Treg на периферии. Эти периферически индуцированные Treg (pTreg) играют немаловажную роль в поддержании Т-клеточной толерантности, в частности в барьерных тканях, таких как кожа и слизистые оболочки [47]. Индукция pTreg дендритными клетками как *in vivo* так и *in vitro*, требует присутствия трансформирующего фактора роста β (TGF- β) [50], и значительно усиливается метаболитом витамина А ретиноевой кислотой [24], и подавляется фрагментами провоспалительных комплементов C3a и C5a [81]. Выделенные из селезенки мыши $CD11c^+$ дендритные клетки способствуют генерации $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-регуляторных клеток в присутствии TGF- β . Полученные клетки подавляют активность аутоиммунных процессов в модели диабета *in vivo*. [59]. Интересно, что ретиноевая кислота, по-видимому, сама по себе не может быть фактором генерации $FoxP3^+$ T-регуляторных клеток, в то же время Treg, полученные при стимуляции TGF- β и ретиноевой кислотой, более стабиль-

ны, нежели полученные при стимуляции одним TGF- β . Возможно, способность индуцировать pTreg свойственна определенным подтипам ДК, которые могут продуцировать ретиноевую кислоту и находятся в периферических тканях, такие как $CD103^+$ ДК в слизистых оболочках [24], принимающих участие в формировании пищевой толерантности [3, 98], $CD207^+$ ДК в коже [38], и, таким образом, являются миграционными, а не резидентными ДК лимфатических узлов [43, 88].

Немаловажная роль в формировании Treg отводится цитокину IL-10. Толерогенные дендритные клетки, полученные в протоколах с использованием дексаметазона и витамина D3, секретирующие IL-10, стимулируют появление $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ лимфоцитов [90]. Причем эти ДК не только индуцируют появление Treg1-клеток [34], но и усиливают толерогенный потенциал IL-10-продуцирующих Т-регуляторных клеток [3] (рис. 1).

Существуют и другие вероятные способы индукции образования Т-лимфоцитов с регуляторной активностью. Например, показано, что взаимодействие ICOS на поверхности $CD4^+$

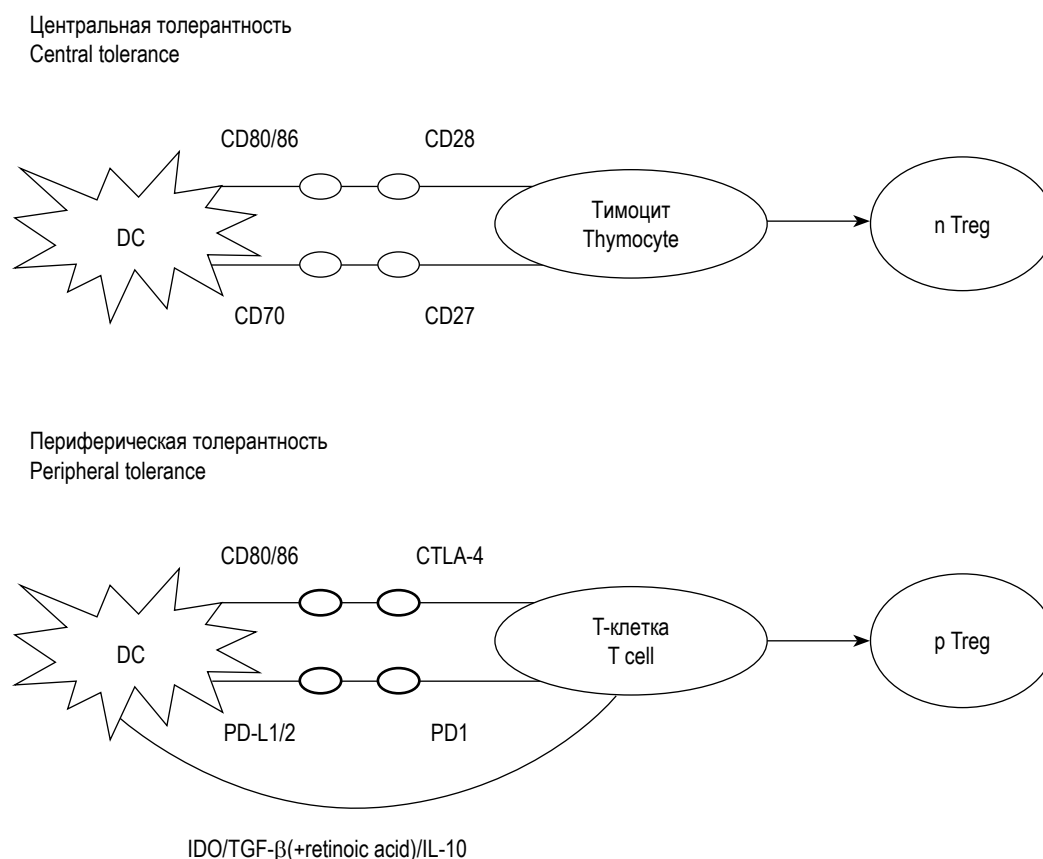


Рисунок 1. Механизмы формирования центральной и периферической толерантности посредством дендритных клеток

Figure 1. Mechanisms of central and peripheral tolerance formation mediated by dendritic cells

лимфоцитов и ICOSL на поверхности ДК приводит к повышению секреции IL-10 CD4⁺ клетками [30].

Другие субтипы Т-клеток с регуляторной активностью также могут быть связаны с эффектами дендритных клеток. Так, плазмацитоидные ДК индуцируют формирование IL-10⁺CCR7⁺CD45RO⁺CD8⁺ клеток с супрессорной активностью в модели рака яичников у человека [95].

Исходя из вышесказанного, можно заключить, что дендритные клетки являются важным звеном в реализации центральной и периферической толерантности, при которой затрагиваются различные молекулярно-клеточные механизмы, что в конечном счете приводит к индукции натуральных и периферических Т-регуляторных клеток.

Характеристика В-регуляторных клеток и механизмы их формирования толерогенными дендритными клетками

Толерогенные дендритные клетки реализуют свои свойства не только за счет прямых иммуносупрессорных воздействий и индукции регуляторных Т-клеток, но также, по последним данным, за счет индукции В-клеток с регуляторными свойствами (табл. 1).

Первые предположения о наличии В-клеток с супрессорной функцией были высказаны в 1970-е гг. и тогда их регуляторная роль связывалась лишь с продукцией «ингибирующих» антител [93]. В дальнейшем была выделена группа В-клеток, способных продуцировать IL-10, которые не только сами оказывали супрессорное воздействие на иммунный ответ, но и стимулировали генерацию Т-регуляторных клеток [93]. Эту группу клеток стали считать В-регуляторными клетками.

В настоящее время под термином «В-регуляторные клетки» понимается достаточно разнородная группа клеток с различными фенотипическими особенностями. Первоначально человеческие Breg-клетки описывались как CD19⁺CD25⁺ лимфоциты, на поверхности которых также высоко экспрессируются молекулы CD27, CD80. Эти клетки не только характеризовались более высокой способностью к презентации антигена, но и повышенным уровнем продукции IL-10. При этом уровень секреции TGF-β не различался достоверно между CD25-позитивными и негативными субпопуляциями [4]. В литературе популяция IL-10-продуцирующих клеток с фенотипом CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ иногда называется B10-клетками. Показано, что данная субпопуляция способна подавлять секрецию TNFα моноцитами [45]. Активация данной субпопуля-

ции клеток CD40-зависима и связана с воздействием LPS и CpG [64].

Позже была идентифицирована другая группа В-клеток с регуляторной активностью и фенотипом CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} (так называемые незрелые В-клетки). Эти клетки подавляли продукцию IFNγ и TNFα антиCD3-стимулированными Т-хелперами, при этом супрессорная активность зависела от IL-10 и CD80/CD86 костимуляции [13, 93].

CD19⁺CD25^{hi}CD86^{hi}IL-10^{hi}TGF-β^{hi} лимфоциты, выделенные из мононуклеарных клеток периферической крови здоровых доноров, при сокультивировании с аутологичными стимулированными CD4⁺ лимфоцитами снижают их пролиферативную активность. Интересно, что дополнительно отмечалось повышение экспрессии молекул FoxP3 и CTLA-4 Т-регуляторными клетками [48, 93].

В последние годы описаны и другие субпопуляции В-регуляторных клеток: CD19⁺CD1d⁺CD5⁺ клетки, подавляющие Th17-ответ [101]; гранзим-продуцирующие В-клетки CD19⁺CD38⁺CD1d⁺IgM⁺CD147⁺, экспрессирующие IL-10, IDO, CD25 [64]; Breg с фенотипом CD25^{hi}CD71^{hi}CD73^{lo}, продуцирующие противовоспалительные IgG4 при аллергических заболеваниях (иногда называемые Breg 1 типа, Br1), а также IL-10 независимые CD39⁺CD73⁺, чье супрессорное воздействие связано с аденозином.

Транскрипционный фактор FoxP3, считаемый одним из маркеров Т-регуляторных клеток, может экспрессироваться и в В-регуляторных клетках, в связи с чем выделяют субпопуляцию CD19⁺CD5⁺FoxP3⁺В-лимфоцитов [11, 97].

Ранее было показано, что ДК с регуляторной активностью, полученные в протоколе с использованием GM-CSF, IL-4, индуцируют дифференцировку селезеночных В-клеток мыши в IL-10-продуцирующие В-клетки с регуляторной активностью и фенотипом CD19^{hi}FcIb^{hi}. При этом в процессе дифференцировки В-клеток участвует IFNβ, секретируемый дендритными клетками, важна также передача сигнала через CD40/CD40L-путь [75]. Кроме того, при совместном культивировании неприлипающей фракции мононуклеаров периферической крови и толерогенных дендритных клеток отмечалось повышение числа В-регуляторных клеток. Вероятно, генерация В-регуляторных клеток была связана с секрецией IL-10 толерогенными ДК [90].

В исследовании, проводимом для оценки безопасности введения аутологичных ДК с супрессорной активностью при сахарном диабете 1 типа, было выявлено увеличение числа B220⁺CD11c⁺CD24⁺CD27⁺В-лимфоцитов в периферической

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ТОЛЕРОГЕННЫХ (РЕГУЛЯТОРНЫХ) КЛЕТОЧНЫХ ПОПУЛЯЦИЙ

TABLE 1. CHARACTERISTICS OF THE TOLEROGENIC (REGULATORY) CELL POPULATIONS

Тип Type	Индукция Induction	Маркеры Markers
nTreg (натуральные [естественные] Т-регуляторные клетки) nTreg (natural T regulatory cells)	тимус thymus	CD4, FoxP3, PD-1, LAG-3, CD-25, CTLA-4, ICOS, GITR
pTreg (индуцированные [периферические] Т-регуляторные клетки) pTreg (induced [peripheral] T regulatory cells)	периферия periphery	CD4, FoxP3, PD-1, LAG-3, CD-25, CTLA-4, ICOS, GITR
Tr1 (Т-регуляторные клетки 1 типа) Tr1 (type 1 T regulatory cells)	периферия periphery	CD4, CD49b, PD-1, LAG-3, CTLA-4, ICOS
B10 (В-клетки, продуцирующие IL-10) B10 (B cells producing IL-10)	периферия periphery	CD19, CD24, CD27, IL-10

крови реципиентов в период введения ДК [36]. В связи с обнаружением экспрессии IL-10 и его выявлением на поверхности этих клеток, данные клетки были расценены как вероятные кандидаты на роль В-лимфоцитов с регуляторной активностью, которые проявляли супрессорные свойства в модели аллогенной смешанной культуры лимфоцитов [37]. Позднее в экспериментах *in vivo* и *in vitro* было показано, что ДК с супрессорной активностью напрямую стимулируют пролиферацию В-регуляторных клеток, и этот процесс предполагает наличие взаимодействия CD40 на поверхности Breg и CD40L на поверхности ДК [37].

Культивирование В-лимфоцитов в присутствии ДК, продуцирующих ретиноевую кислоту, приводит к росту популяции CD19⁺B220⁺CD11c⁺IL-10⁺, содержащей CD19⁺CD24⁺CD27⁺CD38⁺В-лимфоциты с супрессорной активностью, которые также экспрессируют RAR α (retinoic acid receptor alpha) [28]. Обработка CD19⁺ клеток ретиноевой кислотой также приводит к росту числа В-регуляторных клеток, экспрессирующих RAR α , этот эффект отсутствует при обработке антагонистами ретиноевой кислоты [29].

Таким образом, к настоящему времени появились доказательства того, что популяция В-регуляторных клеток играет не последнюю роль в формировании толерантности и может, в том числе, воздействовать на популяцию Т-регуляторных клеток. Генерация В-регуляторных клеток также связана с влиянием толДК, однако точные механизмы этого процесса не вполне установлены.

Молекулы и механизмы, которые принимают участие в толДК-зависимой иммунологической толерантности

Несмотря на разнообразие популяций регуляторных клеток (толерогенные ДК, естественные и индуцированные субпопуляции Treg, Breg), все они обладают схожими механизмами индук-

ции иммуносупрессии: контакт-зависимая, в том числе связанная с модуляцией функций ДК; цитолитическая иммуносупрессия; опосредованная цитотоксичность через цитокины; или изменение метаболического профиля в микроокружении клеток [86].

Для толерогенных ДК характерна индукция толерантности через прямые механизмы — через рецепторы на поверхности самих клеток или секретируемые цитокины, и через опосредованные механизмы — за счет индукции активации и пролиферации Treg и Breg, которые уже осуществляют супрессорную функцию [85] (табл. 2).

В противоположность незрелым ДК, которые способны к индукции толерантности только в отсутствие адекватных костимуляторных сигналов, толДК содержат несколько элементов активной толерантности. Они способны экспрессировать достаточное количество иммуносупрессивных цитокинов, IL-10 и TGF- β , которые оказывают двойной эффект на Т-клетки, так как способствуют дифференцировке наивных Т-клеток в сторону Treg *in vivo* и *in vitro* [20]. Способность толДК секретировать IL-10 в стабильном состоянии или после активации определяет их эффективность в поляризации дифференцировке в сторону Tr1 при необходимости [53]. Кроме того, секреция IL-10 служит позитивной петлей обратной связи для поддержания толерогенного микроокружения толДК и Treg. Иммуносупрессивный эффект IDO связан со многими клетками, включая Т-клетки и ДК. IDO вызывает голодание активированных Т-клеток за счет истощения триптофана, что приводит к ингибированию пролиферации и возрастанию апоптоза клеток. С другой стороны, IDO необходим для поддержания и функционирования Treg и толДК [23]. Изначально фермент гемоксигеназа-1 (HO-1) был открыт как фактор деградации гема, приводящий к образованию железа, биливердина

ТАБЛИЦА 2. РАЗЛИЧНЫЕ ПРЯМЫЕ И ОПОСРЕДОВАННЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИНДУКЦИИ ТОЛЕРАНТНОСТИ, ИСПОЛЬЗУЕМЫЕ ТОЛЕРОГЕННЫМИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ

TABLE 2. DIRECT AND MEDIATED MECHANISMS OF TOLERANCE INDUCTION USED BY TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS

Молекулы Molecules	Функция Function
Растворимые факторы индукции толерантности, используемые толДК Soluble factors of tolerance induction used by tolDCs	
IDO	Участвует в катаболизме триптофана, вызывая его истощение, что приводит к снижению количества CD8⁺ эффекторных клеток и увеличению количества активных FoxP3⁺Treg IDO is involved in tryptophan catabolism by induction of its depletion. As a result, decrease of effector CD8 ⁺ cells percentage and increase of FoxP3 ⁺ Treg percentage occur.
IL-10	Иммуносупрессивный цитокин. Снижает активность Th1-клеток и воспалительный ответ за счет увеличения активности Tr1 и толДК Immunosuppressive cytokine. IL-10 decreases activity of Th1 cells and inflammatory response by increasing activity of Tr1 and tolDCs
TGF-β	Иммуносупрессивный цитокин. Снижает созревание ДК, активацию лимфоцитов за счет увеличения экспрессии FoxP3⁺ Treg. Совместно с IL-27 участвует в подавлении активности Th17-клеток Immunosuppressive cytokine. TGF-β reduces maturation of DCs and activation of lymphocytes by increasing FoxP3 ⁺ expression on Tregs. Together with IL-27, TGF-β is involved in inhibition of Th17-cells activity
HO-1	Участвует в катаболизме гемма и регуляции функции ДК и Т-клеток за счет снижения созревания ДК, увеличения продукции IL-10 и активности Treg HO-1 is involved in heme catabolism and regulation of DCs and T-cells function by decrease DCs maturation, increase IL-10 production and stimulation Treg activity
IFN _γ	Плейотропный цитокин, который при определенных условиях оказывает иммуносупрессивное воздействие за счет увеличения синтеза IDO, экспрессии ILT-4 и HLA-G и поддержки функционирования FoxP3⁺Treg Pleiotropic cytokine. Under certain condition, IFN _γ could be immunosuppressive through IDO synthesis induction, ILT-4 and HLA-G expression, and maintenance of FoxP3 ⁺ Treg function
IL-27	Регулирует активность Т- и В-клеток за счет увеличения секреции IL-10 Th1-клетками и Treg, а также подавляет активность Th17-клеток совместно с TGF-β IL-27 regulates the activity T-cells and B-cells through increasing secretion of IL-10 by Th1-cells and Tregs. Together with TGF-β, IL-27 is involved in inhibition of Th17-cells activity
Рецептор-опосредованные механизмы индукции толерантности толДК Receptor-mediated mechanisms of tolerance induction used by tolDCs	
PD-L1	Ингибиторный лиганд, необходимый для регулирования активации/пролиферации Т-клеток. При связывании со своим рецептором PD-1 блокирует Т-клеточную пролиферацию и продукцию цитокинов, дестабилизирует ДК-Т-клеточный контакт и способствует увеличению активности FoxP3⁺Т-клеток. Количество лиганда увеличивается по мере развития толерантности PD-L1 is inhibitory ligand required for regulation of activation/proliferation T-cells. Interaction with receptor PD-1 leads to prevention of T-cells proliferation and cytokines production, destabilizing of DC-T-cells contact and promotion of FoxP3 ⁺ Tregs activity. Amount of PD-L1 increases as tolerance develops
HLA-G (мембранно-связанный и растворимый) HLA-G (membrane-bound and soluble)	МНС I-ингибиторная молекула, снижает созревание ДК, активность НК и Т-клеток через ILT-2 и ILT-4 сигналинг. Количество HLA-G коррелирует с увеличением активности FoxP3⁺ Treg и развитием толерантности MHC-I is an inhibitory molecule. HLA-G reduces the DCs maturation, NK- and T-cells activity through ILT-2 and ILT-4 signaling. Amount of HLA-G correlates with increasing of FoxP3 ⁺ Tregs activity and tolerance developing process
ILT-2 и ILT-4 ILT-2 and ILT-4	Участвует в передаче негативного межклеточного сигнала от HLA-G-лиганда, снижая Т-клеточную пролиферацию и увеличивая образование IL-10-продуцирующих Т-клеток Molecules are involved in negative intercellular signal from HLA-G. As a result, T-cell proliferation is reduced while amount of IL-10-production T-cells is increased
ICOSL (B7-H2)	Костимуляторная молекула, которая регулирует Т-клеточную активацию при взаимодействии с ICOS за счет стабилизации экспрессии IL-10R на поверхности Т-клеток и переключения дифференцировки Т-клеток в сторону Tr1 ICOSL is co-stimulatory molecule that regulates T-cells activation together with ICOS by stabilization of IL-10R expression on T-cells and switching T-cells differentiation towards Tr1

и СО. Однако сейчас показано, что НО-1 является активным фактором индукции толерантности толДК, подавляя развитие Т-клеточного ответа [67]. ДК, которые экспрессируют НО-1 имеют сниженную способность к созреванию, но в то же время способны продуцировать IL-10 [19]. Кроме того, высвобождаемый под воздействием НО-1 СО блокирует передачу сигнала от TLR [79] и поддерживает активность CD4⁺CD25⁺Treg [17]. IFN γ , несмотря на выраженную провоспалительную активность, необходим для функционирования CD4⁺CD25⁺Treg [100]. Кроме того, IFN γ является основным индуктором IDO [26]. IL-27 является важным продуктом секреции толДК, который способствует индукции секреции IL-10 Т-клетками [8, 32].

Кроме иммуносупрессивных цитокинов, ингибиторные молекулы также экспрессируются на поверхности ДК или секретируются в микроокружение, которое ассоциируется с их толерогенными свойствами. Один из них это лиганд PD-L1 который совместно с PD-L2 связывает рецептор PD-1, экспрессирующийся на активированных Т-клетках. При связывании лиганда со своим рецептором происходит блокирование пролиферации и продукции цитокинов Т-клетками [16]. Кроме того, связывание PD-1/PD-L1, препятствует образованию стабильного конъюгата между Т-клетками и нагруженными антигенами ДК, что приводит к возрастанию Т-клеточной гибели [31]. Другим семейством ингибиторных молекул, которые экспрессируются на поверхности толДК, является семейство ILT, которые структурно и функционально связаны с KIR [21, 22]. На поверхности толДК под воздействием IL-10, HLA-G, истощения триптофана и Treg, экспрессируются лиганды ILT-2 и ILT-4 [15, 63, 76, 89]. Рецептором для этих двух лигандов служит HLA-G — неклассическая молекула МНС, которая экспрессируется также на поверхности толДК в мембранно-связанной или секретируемой формой. Известно, что механизм толДК, ассоциированный с HLA-G/ILT-2/ILT-4, ингибирует функционирование и пролиферацию НК-клеток и Т-клеток, а также подавляет созревание ДК [52, 54]. ICOSL — еще одна молекула, которая *de novo* экспрессируется на поверхности толДК,

структурно напоминает важные коостимуляторные молекулы CD28 и CTLA-4 [42]. При взаимодействии ICOS/ICOSL происходит усиление продукции IL-10 Т-клетками и индукции образования Tr1 [39].

Таким образом, в настоящее время становится очевидным, что индукция иммунологической толерантности — это сложный процесс, связанный с несколькими ключевыми субпопуляциями клеток, обладающих регуляторными свойствами, действующих через схожие механизмы и находящихся в постоянном взаимодействии друг с другом.

Заключение

Толерогенные ДК участвуют в регуляции иммунного ответа, модулируя функциональную активность Т- и В-клеток антиген-специфическим образом. Таким образом, использование толДК представляется перспективным направлением в терапии аутоиммунных заболеваний и трансплантационных осложнений. Толерогенные ДК оказывают свои эффекты через различные регуляторные механизмы, в том числе индукция анергии, генерация клеток с регуляторными функциями, а также антиген-специфическая делеция активированных Т-клеток. Важно, что применение толДК должно производиться с учетом конкретных патогенетических механизмов при развитии того или иного патологического процесса. На данный момент роль толерогенных ДК в поддержании толерантности до конца не установлена, тем не менее обнадеживающие результаты исследований *in vitro* с использованием толерогенных ДК, полученных из клеток пациентов, моделей аутоиммунных заболеваний и моделей трансплантации у животных, обозначили направление для первых клинических испытаний с применением толерогенных ДК. Дальнейшие экспериментальные исследования приведут к лучшему пониманию механизмов сигнализации и реализации иммунологических функций толерогенных ДК, что предоставит дополнительную информацию для разработки подходов применения толерогенных ДК для контроля аутоиммунных заболеваний и трансплантационных осложнений.

Список литературы / References

1. Сенников С.В., Облеухова И.А. Методы индукции толерогенных дендритных клеток у животных и человека // Иммунология, 2016. Т. 37, № 5. С. 291-296. [Sennikov S.V., Obleukhova I.A. Methods of induction tolerogenic dendritic cells in animals and humans. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 5, pp. 291-296. (In Russ.)]
2. Фрейдлин И.С. Регуляторные Т-клетки: происхождение и функции // Медицинская иммунология, 2005. Т. 7, № 4. С. 347-354. [Freidlin I.S. Regulatory T-cells: origin and function. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2005, Vol. 7, no. 4, pp. 347-354. (In Russ.)] doi:10.15789/1563-0625-2005-4-347-354.

3. 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.
4. Amu S., Tarkowski A., Dörner T., Bokarewa M., Brisslert M. The human immunomodulatory CD25⁺ B cell population belongs to the memory B cell pool. *Scand. J. Immunol.*, 2007, Vol. 66, no. 1, pp. 77-86.
5. Anderson A.E., Isaacs J.D. Tregs and rheumatoid arthritis. *Acta Reumatol. Port.*, 2008, Vol. 33, no. 1, pp. 17-33.
6. Apostolopoulos V., Pietersz G.A., Tsibanis A., Tsikkinis A., Stojanovska L., McKenzie I.F., Vassilaros S. Dendritic cell immunotherapy: clinical outcomes. *Clin. Transl. Immunology*, 2014, Vol. 3, no. 7, e21. doi: 10.1038/cti.2014.14.
7. Aschenbrenner K., D'Cruz L.M., Vollmann E.H., Hinterberger M., Emmerich J., Swee L.K., Rolink A., Klein L. Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 4, pp. 351-358.
8. Awasthi A., Carrier Y., Peron J.P., Bettelli E., Kamanaka M., Flavell R.A., Kuchroo V.K., Oukka M., Weiner H.L. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 1380-1389.
9. Bar-On L., Birnberg T., Ki K.W., Jun S. Dendritic cell-restricted CD80/86 deficiency results in peripheral regulatory T-cell reduction but is not associated with lymphocyte hyperactivation. *Eur. J. Immunol.*, 2011, Vol. 41, no. 2, pp. 291-298.
10. Belladonna M.L., Grohmann U., Guidetti P., Volpi C., Bianchi R., Fioretti M.C., Schwarcz R., Fallarino F., Puccetti P. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J. Immunol.* 2006, Vol. 177, no. 1, pp. 130-137.
11. Berthelot J.M., Jamin C., Amrouche K., Le Goff B., Maugars Y., Youinou P. Regulatory B cells play a key role in immune system balance. *Joint Bone Spine*, 2013, Vol. 80, no. 1, pp. 18-22.
12. Birnberg T., Bar-On L., Sapoznikov A., Caton M.L., Cervantes-Barragan L., Makia D., Krauthgamer R., Brenner O., Ludewig B., Brockschneider D., Riethmacher D., Reizis B., Jung S. Lack of conventional dendritic cells is compatible with normal development and T cell homeostasis, but causes myeloid proliferative syndrome. *Immunity*, 2008, Vol. 29, no. 6, pp. 986-997.
13. Blair P.A., Noreña L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C. CD19(+) CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity*, 2010, Vol. 32, no. 1, pp. 129-140.
14. Bonifaz L., Bonnyay D., Mahnke K., Rivera M., Nussenzweig M.C., Steinman R.M. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J. Exp. Med.*, 2002, Vol. 196, no. 12, pp. 1627-1638.
15. 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.
16. Brown J.A., Dorfman D.M., Ma F.R., Sullivan E.L., Munoz O., Wood C.R., Greenfield E.A., Freeman G.J. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J. Immunol.*, 2003, Vol. 170, no. 3, pp. 1257-1266.
17. Brusko T.M., Wasserfall C.H., Agarwal A., Kapturczak M.H., Atkinson M.A. An integral role for heme oxygenase-1 and carbon monoxide in maintaining peripheral tolerance by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2005, Vol. 174, no. 9, pp. 5181-5186.
18. Caielli S., Conforti-Andreoni C., Di Pietro C., Usueli V., Badami E., Malosio M.L., Falcone M. On/off TLR signaling decides proinflammatory or tolerogenic dendritic cell maturation upon CD1d-mediated interaction with invariant NKT cells. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 185, no. 12, pp. 7317-7329.
19. Chauveau C., Remy S., Royer P.J., Hill M., Tanguy-Royer S., Hubert F.X., Tesson L., Brion R., Beriou G., Gregoire M., Josien R., Cuturi M.C., Anegón I. Heme oxygenase-1 expression inhibits dendritic cell maturation and proinflammatory function but conserves IL-10 expression. *Blood*, 2005, Vol. 106, no. 5, pp. 1694-1702.
20. Chen Z.M., O'Shaughnessy M.J., Gramaglia I., Panoskaltsis-Mortari A., Murphy W.J., Narula S., Roncarolo M.G., Blazar B.R. IL-10 and TGF- β induce alloreactive CD4⁺CD25⁺ T cells to acquire regulatory cell function. *Blood*, 2003, Vol. 101, no. 12, pp. 5076-5083.
21. Colonna M., Nakajima H., Cella M. A family of inhibitory and activating Ig-like receptors that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *Semin. Immunol.*, 2000, Vol. 12, no. 2, pp. 121-127.
22. Colonna M., Nakajima H., Navarro F., Lopez-Botet M. A novel family of Ig-like receptors for HLA class I molecules that modulate function of lymphoid and myeloid cells. *J. Leukoc. Biol.*, 1999, Vol. 66, no. 3, pp. 375-381.
23. Cook C.H., Bickerstaff A.A., Wang J.J., Nadasdy T., Della Pelle P., Colvin R.B., Orosz C.G. Spontaneous renal allograft acceptance associated with "regulatory" dendritic cells and IDO. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, no. 5, pp. 3103-3112.
24. Coombes J.L., Siddiqui K.R., Arancibia-Carcamo C.V., Hall J., Sun C.M., Belkaid Y., Powrie F. A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, no. 8, pp. 1757-1764.

25. Coquet J.M., Ribot J.C., Băbala N., Middendorp S., van der Horst G., Xiao Y., Neves J.F., Fonseca-Pereira D., Jacobs H., Pennington D.J., Silva-Santos B., Borst J. Epithelial and dendritic cells in the thymic medulla promote CD4⁺Foxp3⁺ regulatory T cell development via the CD27-CD70 pathway. *J. Exp. Med.*, 2013, Vol. 210, no. 4, pp. 715-728.
26. Curti A., Trabanelli S., Salvestrini V., Baccarani M., Lemoli R.M. The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood*, 2009, Vol. 113, no. 11, pp. 2394-2401.
27. Darrasse-Jeze G., Deroubaix S., Mouquet H., Victora G.D., Eisenreich T., Yao K.H., Masilamani R.F., Dustin M.L., Rudensky A., Liu K., Nussenzweig M.C. Feedback control of regulatory T cell homeostasis by dendritic cells *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 9, pp. 1853-1862.
28. Di Caro V., Phillips B., Engman C., Harnaha J., Trucco M., Giannoukakis N. Involvement of suppressive B-lymphocytes in the mechanism of tolerogenic dendritic cell reversal of type 1 diabetes in NOD mice. *PLoS One*, 2014, Vol. 9, no. 1, e83575. doi: 10.1371/journal.pone.0083575.
29. Di Caro V., Phillips B., Engman C., Harnaha J., Trucco M., Giannoukakis N. Retinoic acid-producing, ex-vivo-generated human tolerogenic dendritic cells induce the proliferation of immunosuppressive B lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 2013, Vol. 174, no. 2, pp. 302-317.
30. Ezzelarab M., Thomson A.W. Tolerogenic dendritic cells and their role in transplantation. *Semin. Immunol.*, 2011, Vol. 23, no. 4, pp. 252-263.
31. Fife B.T., Pauken K.E., Eagar T.N., Obu T., Wu J., Tang Q., Azuma M., Krummel M.F., Bluestone J.A. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 11, pp. 1185-1192.
32. Fitzgerald D.C., Zhang G.X., El-Behi M., Fonseca-Kelly Z., Li H., Yu S., Saris C.J., Gran B., Ciric B., Rostami A. Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat. Immunol.*, 2007, Vol. 8, no. 12, pp. 1372-1379.
33. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Gavin M.A., Rudensky A.Y. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 11, pp. 1142-1151.
34. Fryer M., Grahammer J., Khalifian S., Furtmüller G.J., Lee W.P., Raimondi G., Brandacher G. Exploring cell-based tolerance strategies for hand and face transplantation. *Expert Rev. Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 11, no. 11, pp. 1189-1204.
35. García-González P., Ubilla-Olguín G., Catalán D., Schinnerling K., Aguillón J.C. Tolerogenic dendritic cells for reprogramming of lymphocyte responses in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev.*, 2016, Vol. 15, no. 11, pp. 1071-1080.
36. Giannoukakis N., Phillips B., Finegold D., Harnaha J., Trucco M. Phase I (safety) study of autologous tolerogenic dendritic cells in type 1 diabetic patients. *Diabetes Care*, 2011, Vol. 34, no. 9, pp. 2026-2032.
37. Giannoukakis N., Trucco M. A role for tolerogenic dendritic cell-induced B-regulatory cells in type 1 diabetes mellitus. *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, 2012, Vol. 19, no. 4, pp. 279-287.
38. Williams M., Crozat K., Henri S., Tamoutounour S., Grenot P., Devilard E., de Bovis B., Alexopoulou L., Dalod M., Malissen B. Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 10, pp. 1958-1968.
39. Guillonnet C., Aubry V., Renaudin K., Seveno C., Usal C., Tezuka K., Anegón I. Inhibition of chronic rejection and development of tolerogenic T cells after ICOS-ICOSL and CD40-CD40L co-stimulation blockade. *Transplantation*, 2005, Vol. 80, no. 2, pp. 255-263.
40. Hanabuchi S., Ito T., Park W.R., Watanabe N., Shaw J.L., Roman E., Arima K., Wang Y.H., Voo K.S., Cao W., Liu Y.J. Thymic stromal lymphopoietin-activated plasmacytoid dendritic cells induce the generation of FoxP3⁺ regulatory T cells in human thymus. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 6, pp. 2999-3007.
41. Hawiger D., Inaba K., Dorsett Y., Guo M., Mahnke K., Rivera M., Ravetch J.V., Steinman R.M., Nussenzweig M.C. Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions *in vivo*. *J. Exp. Med.*, 2001, Vol. 194, no. 6, pp. 769-779.
42. Hutloff A., Dittrich A.M., Beier K.C., Eljaschewitsch B., Kraft R., Anagnostopoulos I., Krocze R.A. ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature*, 1999, Vol. 397, no. 6716, pp. 263-266.
43. Idoyaga J., Fiorese C., Zbytnuik L., Lubkin A., Miller J., Malissen B., Mucida D., Merad M., Steinman R.M. Specialized role of migratory dendritic cells in peripheral tolerance induction. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 2, pp. 844-854.
44. Iliev I.D., Spadoni I., Mileti E., Matteoli G., Sonzogni A., Sampietro G.M., Foschi D., Caprioli F., Viale G., Rescigno M. Human intestinal epithelial cells promote the differentiation of tolerogenic dendritic cells. *Gut*, 2009, Vol. 58, no. 11, pp. 1481-1489.
45. Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M., DiLillo D.J., Yanaba K., Venturi G.M., Szabolcs P.M., Bernstein S.H., Magro C.M., Williams A.D., Hall R.P., St Clair E.W., Tedder T.F. Characterization of a rare IL-10-competent B-cell subset in humans that parallels mouse regulatory B10 cells. *Blood*, 2011, Vol. 117, no. 2, pp. 530-541.
46. Jordan M.S., Boesteanu A., Reed A.J., Petrone A.L., Hohenbeck A.E., Lerman M.A., Naji A., Caton A.J. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat. Immunol.*, 2001, Vol. 2, no. 4, pp. 301-306.

47. Josefowicz S.Z., Niec R.E., Kim H.Y., Treuting P., Chinen T., Zheng Y., Umetsu D.T., Rudensky A.Y. Extrathymically generated regulatory T cells control mucosal TH2 inflammation. *Nature*, 2011, Vol. 482, no. 7385, pp. 395-399.
48. Kessel A., Haj T., Peri R., Snir A., Melamed D., Sabo E. Human CD19(+)CD25(high) B regulatory cells suppress proliferation of CD4(+) T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T regulatory cells. *Autoimmun. Rev.*, 2012, Vol. 11, no. 9, pp. 670-677.
49. Koble C., Kyewski B. The thymic medulla: a unique microenvironment for intercellular self-antigen transfer. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 7, pp. 1505-1513.
50. Kretschmer K., Apostolou I., Hawiger D., Khazaie K., Nussenzweig M.C., von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.*, 2005, Vol. 6, no. 12, pp. 1219-1227.
51. Lan Z., Ge W., Arp J., Jiang J., Liu W., Gordon D., Healey D., DeBenedette M., Nicolette C., Garcia B., Wang H. Induction of kidney allograft tolerance by soluble CD83 associated with prevalence of tolerogenic dendritic cells and indoleamine 2,3-dioxygenase. *Transplantation*, 2010, Vol. 90, no. 12, pp. 1286-1293.
52. Le Friec G., Laupeze B., Fardel O., Sebt Y., Pangault C., Guilloux V., Beauplet A., Fauchet R., Amiot L. Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Hum. Immunol.*, 2003, Vol. 64, no. 8, pp. 752-761.
53. Levings M.K., Gregori S., Tresoldi E., Cazzaniga S., Bonini C., Roncarolo M.G. Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells. *Blood*, 2005, Vol. 105, no. 3, pp. 1162-1169.
54. Liang S., Baibakov B., Horuzsko A. HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor. *Eur. J. Immunol.*, 2002, Vol. 32, no. 9, pp. 2418-2426.
55. Lio C.W., Hsieh C.S. A two-step process for thymic regulatory T cell development. *Immunity*, 2008, Vol. 28, no. 1, pp. 100-111.
56. Liston A., Nutsch K.M., Farr A.G., Lund J.M., Rasmussen J.P., Koni P.A., Rudensky A.Y. Differentiation of regulatory Foxp3⁺ T cells in the thymic cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2008, Vol. 105, no. 33, pp. 11903-11908.
57. Liu J., Cao X. Regulatory dendritic cells in autoimmunity: a comprehensive review. *J. Autoimmun.*, 2015, Vol. 63, pp. 1-12.
58. Liu Y.J., Soumelis V., Watanabe N., Ito T., Wang Y.H., Malefyt Rde W., Omori M., Zhou B., Ziegler S.F. TSLP: an epithelial cell cytokine that regulates T cell differentiation by conditioning dendritic cell maturation. *Annu. Rev. Immunol.*, 2007, Vol. 25, pp. 193-219.
59. Luo X., Tarbell K.V., Yang H., Pothoven K., Bailey S.L., Ding R., Steinman R.M., Suthanthiran M. Dendritic cells with TGF-beta1 differentiate naive CD4⁺CD25⁻ T cells into islet-protective Foxp3⁺ regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2007, Vol. 104, no. 8, pp. 2821-2826.
60. Lv H., Havari E., Pinto S., Gottmukkala R.V., Cornivelli L., Raddassi K., Matsui T., Rosenzweig A., Bronson R.T., Smith R., Fletcher A.L., Turley S.J., Wucherpfennig K., Kyewski B., Lipes M.A. Impaired thymic tolerance to alpha-myosin directs autoimmunity to the heart in mice and humans. *J. Clin. Invest.* 2011, Vol. 121, no. 4, pp. 1561-1573.
61. Mahmud S.A., Manlove L.S., Schmitz H.M., Xing Y., Wang Y., Owen D.L., Schenkel J.M., Boomer J.S., Green J.M., Yagita H., Chi H., Hogquist K.A., Farrar M.A. Costimulation via the tumor-necrosis factor receptor superfamily couples TCR signal strength to the thymic differentiation of regulatory T cells. *Nat. Immunol.* 2014, Vol. 15, no. 5, pp. 473-481.
62. Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Henk A., Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol. Cell Biol.*, 2002, Vol. 80, no. 5, pp. 477-483.
63. Manavalan J.S., Rossi P.C., Vlad G., Piazza F., Yarilina A., Cortesini R., Mancini D., Suciuc-Foca N. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl. Immunol.*, 2003, Vol. 11, no. 3-4, pp. 245-258.
64. Mauri C., Menon M. The expanding family of regulatory B cells. *Int. Immunol.*, 2015, Vol. 27, no. 10, pp. 479-486.
65. Mazzucchelli R., Hixon J.A., Spolski R., Chen X., Li W.Q., Hall V.L., Willette-Brown J., Hurwitz A.A., Leonard W.J., Durum S.K. Development of regulatory T cells requires IL-7Ralpha stimulation by IL-7 or TSLP. *Blood*, 2008, Vol. 112, no. 8, pp. 3283-3292.
66. Mellor A.L., Munn D.H. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.*, 2004, Vol. 4, no. 10, pp. 762-774.
67. Moreau A., Hill M., Thebault P., Deschamps J.Y., Chiffolleau E., Chauveau C., Moullier P., Anegon I., Alliot-Licht B., Cuturi M.C. Tolerogenic dendritic cells actively inhibit T cells through heme oxygenase-1 in rodents and in nonhuman primates. *FASEB J.*, 2009, Vol. 23, no. 9, pp. 3070-3077.
68. Morelli A.E., Thomson A.W. Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunol. Rev.* 2003, Vol. 196, pp. 125-146.
69. Nencioni A., Beck J., Werth D., Grünebach F., Patrone F., Ballestrero A., Brossart P. Histone deacetylase inhibitors affect dendritic cell differentiation and immunogenicity. *Clin. Cancer Res.*, 2007, Vol. 13, no. 13, pp. 3922-3941.
70. Oh J., Shin J.S. The Role of Dendritic Cells in Central Tolerance. *Immune Netw.*, 2015, Vol. 15, no. 3, pp. 111-120.

71. Ohnmacht C., Pullner A., King S.B., Drexler I., Meier S., Brocker T., Voehringer D. Constitutive ablation of dendritic cells breaks self-tolerance of CD4 T cells and results in spontaneous fatal autoimmunity. *J. Exp. Med.*, 2009, Vol. 206, no. 3, pp. 549-559.
72. Pallotta M.T., Orabona C., Volpi C., Vacca C., Belladonna M.L., Bianchi R., Servillo G., Brunacci C., Calvitti M., Biciato 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.
73. Park J.H., Choi A.J., Kim S.J., Jeong S.Y. 3,3'-Diindolylmethane Inhibits Flt3L/GM-CSF-induced-bone Marrow-derived CD103(+) Dendritic Cell Differentiation Regulating Phosphorylation of STAT3 and STAT5. *Immune Netw.*, 2015, Vol. 15, no. 6, pp. 278-290.
74. Probst H.C., Muth S., Schild H. Regulation of the tolerogenic function of steady-state DCs. *Eur. J. Immunol.*, 2014, Vol. 44, no. 4, pp. 927-933.
75. Qian L., Qian C., Chen Y., Bai Y., Bao Y., Lu L., Cao X. Regulatory dendritic cells program B cells to differentiate into CD19hiFcγRIIbhi regulatory B cells through IFN-β and CD40L. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 3, pp. 581-591.
76. Ristich V., Liang S., Zhang W., Wu J., Horuzsko A. Tolerization of dendritic cells by HLA-G. *Eur. J. Immunol.*, 2005, Vol. 35, no. 4, pp. 1133-1142.
77. Ronet C., Haucion-La Torre Y., Revaz-Breton M., Mastelic B., Tacchini-Cottier F., Louis J., Launois P. Regulatory B cells shape the development of Th2 immune responses in BALB/c mice infected with Leishmania major through IL-10 production. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 2, pp. 886-894.
78. Salomon B., Lenschow D.J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A., Bluestone J.A. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity*, 2000, Vol. 12, no. 4, pp. 431-440.
79. Soares M.P., Bach F.H. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol. Med.*, 2009, Vol. 15, no. 2, pp. 50-58.
80. Steinman R.M., Hawiger D., Nussenzweig M.C. Tolerogenic dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, Vol. 21, pp. 685-711.
81. Strainic M.G., Shevach E.M., An F., Lin F., Medof M.E. Absence of signaling into CD4(+) cells via C3aR and C5aR enables autoinductive TGF-β1 signaling and induction of Foxp3(+) regulatory T cells. *Nat. Immunol.*, 2012, Vol. 14, no. 2, pp. 162-171.
82. Stuart L.M., Lucas M., Simpson C., Lamb J., Savill J., Lacy-Hulbert A., Inhibitory effects of apoptotic cell ingestion upon endotoxin-driven myeloid dendritic cell maturation. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, no. 4, pp. 1627-1635.
83. Su X., Qian C., Zhang Q., Hou J., Gu Y., Han Y., Chen Y., Jiang M., Cao X. miRNomes of haematopoietic stem cells and dendritic cells identify miR-30b as a regulator of Notch1. *Nat. Commun.*, 2013, Vol. 4, p. 2903.
84. Suffner J., Hochweller K., Kuhnle M.C., Li X., Kroczeck R.A., Garbi N., Hammerling G.J. Dendritic cells support homeostatic expansion of Foxp3⁺ regulatory T cells in Foxp3.LuciDTR mice. *J. Immunol.*, 2010, Vol. 184, no. 4, pp. 1810-1820.
85. Švajger U., Rožman P. Tolerogenic dendritic cells: molecular and cellular mechanisms in transplantation. *J. Leukoc. Biol.*, 2014, Vol. 95, no. 1, pp. 53-69.
86. van Herk E.H., Te Velde A.A. Treg subsets in inflammatory bowel disease and colorectal carcinoma. Characteristics, role and therapeutic targets. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2016, Vol. 31, no. 8, pp. 1393-1404.
87. van Meerwijk J.P., Marguerat S., Lees R.K., Germain R.N., Fowlkes B.J., MacDonald H.R. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J. Exp. Med.*, 1997, Vol. 185, no. 3, pp. 377-383.
88. Vitali C., Mingozzi F., Broggi A., Barresi S., Zolezzi F., Bayry J., Raimondi G., Zanoni I., Granucci F. Migratory, and not lymphoid-resident, dendritic cells maintain peripheral self-tolerance and prevent autoimmunity via induction of iTreg cells. *Blood*, 2012, Vol. 120, no. 6, pp. 1237-1245.
89. Vlad G., Piazza F., Colovai A., Cortesini R., Della Pietra F., Suciuc-Foca N., Manavalan J.S. Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Hum. Immunol.*, 2003, Vol. 64, no. 5, pp. 483-489.
90. Volchenkov R., Karlsen M., Jonsson R., Appel S. Type 1 regulatory T cells and regulatory B cells induced by tolerogenic dendritic cells. *Scand. J. Immunol.*, 2013, Vol. 77, no. 4, pp. 246-254.
91. Voll R.E., Herrmann M., Roth E.A., Stach C., Kalden J.R., Girkontaite I. Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature*, 1997, Vol. 390, no. 6658, pp. 350-351.
92. Wang P., Xue Y., Han Y., Lin L., Wu C., Xu S., Jiang Z., Xu J., Liu Q., Cao X. The STAT3-binding long noncoding RNA Inc-DC controls human dendritic cell differentiation. *Science*, 2014, Vol. 344, no. 6181, pp. 310-313.
93. Wang Y., Han X. B Cells with Regulatory Function in Human Disease. *Autoimmune Dis. Ther. Approaches*, 2014, Vol. 1, no. 2, pp. 9-17.
94. Watanabe N., Wang Y.H., Lee H.K., Ito T., Wang Y.H., Cao W., Liu Y.J. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature*, 2005, Vol. 436, no. 7054, pp. 1181-1185.
95. Wei S., Kryczek I., Zou L., Daniel B., Cheng P., Mottram P., Curiel T., Lange A., Zou W. Plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ regulatory T cells in human ovarian carcinoma. *Cancer Res.*, 2005, Vol. 65, no. 12, pp. 5020-5026.

96. Wolach O., Shpilberg O., Lahav M. Neutropenia after rituximab treatment: new insights on a late complication. *Curr. Opin. Hematol.*, 2012, Vol. 19, no. 1, pp. 32-38.
97. Xing C., Ma N., Xiao H., Wang X., Zheng M., Han G., Chen G., Hou C., Shen B., Li Y., Wang R. Critical role for thymic CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi}IL-10⁺ regulatory B cells in immune homeostasis. *J. Leukoc. Biol.*, 2015, Vol. 97, no. 3, pp. 547-556.
98. Yamazaki S., Steinman R.M. Dendritic cells as controllers of antigen-specific Foxp3⁺ regulatory T cells. *J. Dermatol. Sci.*, 2009, Vol. 54, no. 2, pp. 69-75.
99. Yamazaki T., Akiba H., Iwai H., Matsuda H., Aoki M., Tanno Y., Shin T., Tsuchiya H., Pardoll D.M., Okumura K., Azuma M., Yagita H. Expression of programmed death 1 ligands by murine T cells and APC. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 10, pp. 5538-5545.
100. Zhang J. Yin and yang interplay of IFN- γ in inflammation and autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* 2007, Vol. 117, no. 4, pp. 871-873.
101. Zhang M., Zheng X., Zhang J., Zhu Y., Zhu X., Liu H., Zeng M., Graner M.W., Zhou B., Chen X. CD19(+) CD1d(+)CD5(+) B cell frequencies are increased in patients with tuberculosis and suppress Th17 responses. *Cell Immunol.*, 2012, Vol. 274, no. 1-2, pp. 89-97.

Авторы:

Сенников С.В. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Куликова Е.В. — к.б.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Кнауэр Н.Ю. — младший научный сотрудник лаборатории клинической иммунопатологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Хантакова Ю.Н. — к.м.н., научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии», г. Новосибирск, Россия

Authors:

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

Kulikova E.V., PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Knauer N.Yu., Junior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunopathology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Khantakova Yu.N., PhD (Medicine), Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Research Institute of Fundamental and Clinical Immunology, Novosibirsk, Russian Federation

Поступила 13.01.2017

Отправлена на доработку 26.01.2017

Принята к печати 09.02.2017

Received 13.01.2017

Revision received 26.01.2017

Accepted 09.02.2017

ИНДУКЦИЯ ДОЛГОВРЕМЕННОЙ Т- И В-КЛЕТОЧНОЙ ИММУНОЛОГИЧЕСКОЙ ПАМЯТИ К ВИРУСУ ГРИППА А (H5N1) У ЛЮДЕЙ, ПРИВИТЫХ ЖИВОЙ ГРИППОЗНОЙ ВАКЦИНОЙ А(H5N2)

Лосев И.В.¹, Дони́на С.А.¹, Петухова Г.Д.¹, Кореньков Д.А.¹,
Ерофеева М.К.², Стукова М.А.², Руденко Л.Г.¹, Найхин А.Н.¹

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

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последние годы в мировой вирусологии активно развивается новая стратегия вакцинации людей против потенциально пандемических вирусов гриппа А: комбинационная вакцинация (prime-boost vaccination). Она предусматривает усиление (бустирование) иммунного ответа к одной вакцине с помощью предварительной прививки (праймирование) другой вакциной. Нами впервые изучен вопрос об иммунологических последствиях для людей праймирования отечественной живой гриппозной вакциной ЖГВ H5N2 с последующим (через 1,5 года) их бустированием отечественной инактивированной гриппозной вакциной ИГВ H5N1. В отличие от непраймированных волонтеров у праймированных после однократной прививки ИГВ H5N1 наблюдалась ускоренная и усиленная продукция сывороточных антител (РТГА, РМН, ИФА). Это касалось антител к вакцинному штамму А (H5N1) и другим гетерологичным штаммам с гемагглютинином H5. У праймированных лиц антитела обладали более высокой авидностью по сравнению с непраймированными. Перед прививкой ИГВ H5N1 у первых титры IgG-антител к вирусу А(H5N1), а также уровень специфических к нему CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти оказались выше, чем у вторых. Бустирующий эффект ИГВ H5N1 не коррелировал с данными РТГА и РМН по иммуногенности праймирующей ЖГВ H5N2. В целом полученные результаты обосновывают новое направление в использовании отечественных ЖГВ для защиты от потенциально пандемического вируса гриппа А.

Ключевые слова: вирус гриппа, иммунологическая память, вакцина гриппозная, пандемические вирусы гриппа

INDUCTION OF LONG-TERM T AND B CELL MEMORY IMMUNITY TO INFLUENZA A VIRUS (H5N1) IN PERSONS VACCINATED WITH LIVE INFLUENZA A VACCINE (H5N2)

Losev I.V.^a, Donina S.A.^a, Petukhova G.D.^a, Korenkov D.A.^a,
Erofeeva M.K.^b, Stukova M.A.^b, Rudenko L.G.^a, Naykhin A.N.^a

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

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

Abstract. Over last years, a novel strategy for vaccination of people against potentially pandemic influenza A viruses is actively developed worldwide, i.e., a combined (prime-boost) vaccination. It provides amplification

Адрес для переписки:

Лосев Игорь Владимирович
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-42-92.
E-mail: iemlosev@gmail.com

Address for correspondence:

Losev Igor V.
Research Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-42-92.
E-mail: iemlosev@gmail.com

Образец цитирования:

И.В. Лосев, С.А. Дони́на, Г.Д. Петухова, Д.А. Кореньков,
М.К. Ерофеева, М.А. Стукова, Л.Г. Руденко, А.Н. Найхин
«Индукция долговременной Т- и В-клеточной
иммунологической памяти к вирусу гриппа А (H5N1)
у людей, привитых живой гриппозной вакциной А(H5N2)»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 375–386.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-375-386

© Лосев И.В. и соавт., 2017

For citation:

I.V. Losev, S.A. Donina, G.D. Petukhova, D.A. Korenkov,
M.K. Erofeeva, M.A. Stukova, L.G. Rudenko, A.N. Naykhin
“Induction of long-term T and B cell memory immunity to
influenza A virus (H5N1) in persons vaccinated with live
influenza A vaccine (H5N2)”, Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 375–386.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-375-386

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-375-386

(boosting) of immune response for a vaccine by means of pre-vaccination (priming) with another vaccine. We have first studied an issue of immunological consequences for people after priming by live attenuated influenza H5N2 vaccine (LAIV), followed by a boost with inactivated influenza H5N1 vaccine (IIV) 1.5 years later. Unlike non-primed volunteers, the primed persons developed more rapid and high production of serum antibodies (of HAI-, MN-, ELISA-types) after a single vaccination with H5N1 IIV. That concerned induction of antibodies to the H5N1 vaccinal strain A, and other heterologous strains containing H5 haemagglutinin. In primed persons, the antibodies showed higher avidity as compared to non-primed individuals. Before inoculation with H5N1 IIV, the IgG-antibody titers to A virus (H5N1), and the levels of specific CD4⁺ and CD8⁺ memory T-cells proved to be higher in primed subjects than in non-primed persons. The boosting effect of H5N1 IIV did not correlate with HAI- and MN-based data on immunogenicity of priming H5N2 live attenuated vaccine. In general, the results obtained justify a new direction in applications of LAIVs for protection against potentially pandemic influenza virus A.

Keywords: influenza virus, immunological memory, influenza vaccina, pandemic influenza A viruses

Введение

Вирусы гриппа А вызывают ежегодные сезонные эпидемии и пандемии. Этиологическими агентами пандемий являются сероподтипы вируса с обновленным гемагглютинином (HA). В последнее столетие зафиксированы пандемии гриппа А(H1N1), А(H2N2) и А(H3N2). С 2001 г. среди людей периодически регистрируются вспышки гриппа А, вызванные птичьими вирусами с HA H5, H7 и H9. Вспышки гриппа А(H5N1) и А(H7N9) сопровождались тяжелыми клиническими проявлениями с высокой летальностью. Это побудило к созданию под эгидой ВОЗ резервных живых аттенуированных (ЖГВ) и инактивированных (ИГВ) гриппозных вакцин, включающих потенциально пандемические птичьи вирусы гриппа А(H5N1), А(H5N2), А(H6N1), А(H7N3), А(H7N9) и А(H9N2) [19]. Все эти вакцины были ареактогенны. Однако они вызывали у добровольцев довольно слабый гуморальный иммунный ответ по интенсивности индукции сывороточных антигемагглютинирующих и вируснейтрализующих антител. Данное обстоятельство послужило побудительным моментом для использования так называемой комбинационной стратегии вакцинации против потенциально пандемических вирусов гриппа А [15]. Она основана на предварительной иммунизации (праймировании) людей одной вакциной для достижения усиленного (бустированного) иммунного ответа на последующее введение другой вакцины. Подразумевается, что праймирование может формировать долговременную клеточную иммунологическую память, которая усилит, ускорит и расширит спектр иммунного ответа на буст-вакцину.

Эффективность режима «праймирование — бустирование» показана на вакцинах против ряда инфекционных агентов, включающих ВИЧ, *Mycobacterium tuberculosis*, *Plasmodium malariae* [15]. Изучался данный вопрос и в отношении вакцинации против потенциально пандемических птичьих вирусов гриппа А, в подавля-

ющем большинстве — применительно к защите от вируса А(H5N1). Так, использование праймирующей неадьювантной ИГВ H5N3 для бустирования иммунного ответа у людей на неадьювантную ИГВ H5N1 не дало ожидаемого эффекта из-за низкой иммуногенности первой, тогда как праймирующая адьювантная ИГВ H3N2 бустировала гуморальный иммунный ответ на ИГВ H5N1 [16]. Бустирование гуморального иммунного ответа на ИГВ H5N1 отмечено при применении в качестве праймирующих рекомбинантной H5-вакцины [10], ДНК-вакцин H5N1 [14] и аденовирусной векторной вакцины H5N1 [14]. Недавно американскими авторами показано, что отдаленное (5 лет назад) праймирование волонтеров ЖГВ H5N1 мощно бустировало продукцию сывороточных антител после прививки ИГВ H5N1 [18]. В настоящей статье проанализирован вопрос возможности бустирования у людей иммунного ответа отечественной ИГВ H5N1 с помощью отдаленной во времени (1,5 года назад) прививки отечественной ЖГВ H5N2.

Материалы и методы

Волонтеры и вакцины

Рандомизированным двойным слепым методом волонтеры 18–46 лет были разделены на две группы: привитые двукратно в 2012 г. (18 месяцев назад) отечественной ЖГВ H5N2 (опытная группа) и не прививавшиеся этим препаратом (контрольная группа). Обе группы в 2014 г. вакцинировали двукратно отечественной субъединичной адсорбированной ИГВ «Orny Flu» производства ФГУП «НПО «Микроген». Каждая доза вакцины (0,5 мл) содержала 15 мкг гемагглютинина вируса гриппа А(H5N1). Венозную кровь отбирали до прививки (Д0), через 7 дней после первой прививки (Д7), через 28 дней после первой прививки (Д28) и через 28 дней после второй прививки (Д56). По полу и возрасту группы существенно не различались. Испытания проведены в полном соответствии с национальным стандартом Рос-

сийской Федерации (ГОСТ 352379-2005) «Надлежащие клинические испытания»

Праймирующая ЖГВ H5N2 разработана в отделе вирусологии НИИЭМ из штамма А/17/инд/Турция/05/133(H5N2). В результате reassortации эта вакцина включала модифицированный гемагглютинин H5 от вируса данного вакцинного штамма, нейраминидазу N2, а также все внутренние белки от донора аттенуации А/Ленинград/134/17/57(H2N2).

Определение сывороточных антигемагглютинирующих антител в реакции торможения гемагглютинации (РТГА) выполняли по общепринятой методике. Рабочая доза антигена составляла 4 АЕ при использовании 1% лошадиных эритроцитов. Достоверными увеличениями (конверсиями) титров антител считали их поствакцинальное возрастание в 4 и более раза по отношению к довакцинальному уровню.

Определение сывороточных антител в реакции микронейтрализации (РМН) проводили на культуре клеток MDCK по методике ВОЗ [17]. Достоверными конверсиями титров антител считали их поствакцинальное повышение в 4 и более раза в сравнении с довакцинальным уровнем.

Определение сывороточных IgA- и IgG-антител в непрямом варианте иммуноферментного анализа (ИФА) осуществляли по ранее описанной методике [4], используя в качестве подложки 16 АЕ антигена (вакцинного штамма), очищенного и сконцентрированного в 30-60% градиенте плотности сахарозы. За титр антител сывороток крови принимали последнее разведение образца, оптическая плотность (ОП) которого превышала в 2 и более раза среднее арифметическое значение ОП контрольных лунок (все компоненты, кроме образцов сывороток крови). Достоверными конверсиями титров антител считали их поствакцинальное повышение в 4 и более раза по отношению к довакцинальному уровню.

Определение авидности сывороточных IgA- и IgG-антител в ИФА осуществляли по ранее разработанной методике с расчетом индексов их авидности [1].

Определение вирусспецифических CD8⁺Т-лимфоцитов памяти в проточной цитофлюориметрии

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли на градиенте, отмывали и хранили в жидком азоте до исследования. Для выявления специфичных к вирусу Т-клеток использовали общепринятый метод внутриклеточного окрашивания цитокинов (IFN γ) [11] после стимуляции клеток *in vitro* 12 МОИ очищенного вакцинного штамма. Для определения спонтанной

продукции интерферона вместо стимулятора к клеткам добавляли соответствующий объем питательной среды RPMI-1640. При анализе эти данные (отрицательный контроль) вычитались из показателей, полученных для вирусстимулированных клеток. В качестве положительного контроля использовалась стимуляция клеток стафилококковым энтеротоксином В, который вызывает массовую неспецифическую активацию Т-лимфоцитов. После разморозки клетки волонтеров, отобранные во всех временных точках, были способны к активации и продукции IFN γ . CD8⁺Т-лимфоциты центральной (T_{cm}) и эффекторной (T_{em}) иммунологической памяти определяли по фенотипу, соответственно, CD8⁺IFN⁺CCR7⁺CD45RA⁻ и CB8⁺IFN⁺CCR7⁻CD45⁻ [11]

Определение в надосадках культур МПК плазмобластных поликлональных антител (plasmablast-derived polyclonal antibody – PPAbs) проводили по методике [3, 12]. МПК выделяли на градиенте стандартным методом. Полученные клетки культивировали в течение 4 дней при 37 °С в атмосфере, содержащей 5% CO₂. По окончании инкубации собирали надосадки культур МПК, которые очищали центрифугированием. Полученные образцы замораживали при температуре -20 °С до исследования в ИФА по той же технологии, что и сывороточные IgA- и IgG-антитела.

Статистическую обработку результатов выполнили с использованием программного обеспечения Statistica 6 и GraphPad Prism 5. Для сравнения данных применяли следующие тесты: Wilcoxon Matched Pairs Test, Friedman ANOVA и Fisher exact (two-tailed).

Результаты

В таблицах 1-3 представлены данные о поствакцинальном гуморальном иммунном ответе волонтеров на прививку ЖГВ H5N2 в 2012 г. (праймирование) и последующую прививку ИГВ H5N1 в 2014 г. (бустирование). Контрольной группой служили непраймированные лица, иммунизированные только ИГВ H5N1 в 2014 г. Выявляли пулы сывороточных антигемагглютинирующих (РТГА) и вируснейтрализующих (РМН) антител, а также сывороточных IgA- и IgG-антител (ИФА). Иммунный ответ определяли как к праймирующему А(H5N2), так и к бустирующему А(H5N1) вирусам.

При анализе этих результатов обращают на себя внимание следующие факты.

Первый – перед прививкой ИГВ H5N1 (D0) средние геометрические титры (СГТ) антител

ТАБЛИЦА 1. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОДУКЦИИ АНТИГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ (РТГА) И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ (РМН) СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ВОЛОНТЕРОВ ПРАЙМИРУЮЩЕЙ ЖГВ H5N2 И БУСТИРУЮЩЕЙ ИГВ H5N1

TABLE 1. INTENSITY OF HA1 ANTIBODIES AND NEUTRALIZING ANTIBODIES PRODUCTION IN VOLUNTEERS AFTER PRIMING WITH LAIV H5N2 FOLLOWED BY IIV H5N1 BOOST

Обратные величины средних геометрических титров (СГТ) антител Serum antibody geometric mean titers (GMT)																			
Лабораторный тест Laboratory test	Вirus гриппа А Influenza A virus	Прививка ЖГВ H5N2 в 2012 г. – праймирование волонтеров (N = 19) Vaccination with LAIV H5N2 in 2012, primed volunteers (N = 19)						Прививка ИГВ H5N1 в 2014 г. тех же лиц – бустирование волонтеров (N = 19) Vaccination with IIV H5N1 in 2014 (same group), boost (N = 19)						Прививка ИГВ H5N1 в 2014 г. контрольной группы волонтеров – непраймированные ЖГВ H5N2 люди (N = 24) Vaccination with IIV H5N1 in 2014, control group of volunteers without LAIV H5N2 priming (N = 24)					
		D0*	D28*	D56*	D56/D0	D0	D7	D28	D56	D7/D0	D28D56/D0	D0	D7	D28	D56	D7/D0	D28D56/D0		
		3	4	5	2,5	3	6 ¹	43 ²	62 ³	2,0	20,7	3	3 ¹	6 ²	8 ³	1,0	2,5		
		3	3	3	1,0	3	8 ⁴	32 ⁵	45 ⁶	2,5	15,0	3	3 ⁴	6 ⁵	9 ⁶	1,0	3,0		
		5	6	11	2,0	14 ⁷	138 ⁸	398 ⁹	398 ¹⁰	9,2	26,5	6 ⁷	25 ⁸	57 ⁹	147 ¹⁰	4,2	24,5		
PTGA HAI assay	H5N2**	3	4	5	2,5	3	6 ¹	43 ²	62 ³	2,0	20,7	3	3 ¹	6 ²	8 ³	1,0	2,5		
	H5N1**	3	3	3	1,0	3	8 ⁴	32 ⁵	45 ⁶	2,5	15,0	3	3 ⁴	6 ⁵	9 ⁶	1,0	3,0		
PMH MN	H5N2	5	6	11	2,0	14 ⁷	138 ⁸	398 ⁹	398 ¹⁰	9,2	26,5	6 ⁷	25 ⁸	57 ⁹	147 ¹⁰	4,2	24,5		
	H5N1	n/a***	n/a****	n/a***	n/a***	8	67 ¹¹	166 ¹²	239 ¹³	8,4	30,0	6	16 ¹¹	32 ¹²	73 ¹³	2,5	12,2		

Примечание. Цифры 1-13 означают достоверные отличия СГТ антител. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – p < 0,05; 2 – p < 0,01; 3 – p < 0,001; 4 – p < 0,001; 5 – p < 0,05; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,05; 8 – p < 0,01; 9 – p < 0,01; 10 – p < 0,01; 11 – p < 0,001; 12 – p < 0,01; 13 – p < 0,001.

* – D0 – до прививки; Д7 – через 7 дней после 1-й прививки; Д28 – через 28 дней после 1-й прививки; Д56 – через 28 дней после 2-й прививки. Д7/Д0, Д28/Д0 и Д56/Д0 – кратность прироста СГТ антител.

** – H5N2 – А/индюк/Турция/05/133; H5N1 – NIBRG-23.

*** – не исследовали.

Note. Numbers 1 to 13 show significance levels for the differences in antibody GMTs. The differences are listed as pairs for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – p < 0,05; 2 – p < 0,01; 3 – p < 0,001; 4 – p < 0,001; 5 – p < 0,05; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,05; 8 – p < 0,01; 9 – p < 0,01; 10 – p < 0,01; 11 – p < 0,001; 12 – p < 0,01; 13 – p < 0,001. * – D0, before vaccination; D7 – 7 days after 1st vaccination; D28 – 28 days after the 1st vaccination; D56 – 28 days after 2nd vaccination. D7/D0, D28/D0 and D56/D0 denote fold changes in antibody GMT.

** – H5N2 – A/turkey/Turkey/05/133; H5N1 – NIBRG-23.

*** – n/a – not applicable.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТА КОНВЕРСИЙ АНТИГЕМАГГЛЮТИНИРУЮЩИХ (РТГА) И ВИРУСНЕЙТРАЛИЗУЮЩИХ (РМН) СЫВОРОТОЧНЫХ АНТИТЕЛ ПОСЛЕ ИММУНИЗАЦИИ ВОЛОНТЕРОВ ПРАЙМИРУЮЩЕЙ ЖГВ H5N2 И БУСТИРУЮЩЕЙ ИГВ H5N1

TABLE 2. FREQUENCY OF HAI AND NEUTRALIZING ANTIBODY CONVERSION IN VOLUNTEERS AFTER LAIV H5N2 PRIMING FOLLOWED BY IIV H5N1 BOOST

Лабораторный тест Laboratory test	Штамм вируса гриппа А Influenza A virus	% лиц с конверсиями антител (АТ) и % лиц с защитными титрами АТ % of persons with Ab conversions, and % of persons with protective titers													
		После прививки ЖГВ H5N2 в 2012 г. – праймирование волонтеров (N = 19) Vaccination with LAIV H5N2 in 2012, priming of the volunteers (N = 19)				После прививки ИГВ H5N1 в 2014 г. тех же лиц – бустирование волонтеров (N = 19) Vaccination with IIV H5N1 in 2014 (same group), boost (N = 19)				После прививки ИГВ H5N1 в 2014 г. контрольной группе волонтеров – непраймированные ЖГВ H5N2 люди (N = 24) Vaccination with IIV H5N1 in 2014, control group of volunteers without LAIV H5N2 priming (N = 24)					
		Д28* D28	Д56* D56	% с титром АТ ≥ 1:40 Ab titer ≥ 1:40		Д7* D7	Д28 D28	Д56 D56	% с титром АТ ≥ 1:40 Ab titer ≥ 1:40		Д7 D7	Д28 D28	Д56 D56	% с титром АТ ≥ 1:40 Ab titer ≥ 1:40	
РТГА HAI assay	NIBRG-23 (H5N1)	0	0	0	0	26 ¹	58 ²	73	58 ³	73 ⁴	8 ¹	29 ²	50	12 ³	29 ⁴
	A/Indonesia/05/2005 (H5N1)	0	0	0	0	42 ⁵	63	79	63 ⁶	73 ⁷	8 ⁵	42	54	17 ⁶	38 ⁷
	A/turkey/ Turkey/05/133 (H5N2)	21	42	0	0	26 ⁸	68 ⁹	79 ¹⁰	58 ¹¹	63 ¹²	8 ⁸	25 ⁹	41 ¹⁰	13 ¹¹	21 ¹²
	A/duck/ Potsdam/86/92(H5N2)	21	37	0	0	37 ¹³	74 ¹⁴	74 ¹⁵	58 ¹⁶	74 ¹⁷	13 ¹³	29 ¹⁴	42 ¹⁵	17 ¹⁶	33 ¹⁷
РМН MN	NIBRG-23 H5N1	НИ	НИ	11	2,0	58	95 ¹⁸	100	89 ¹⁹	100	46	67 ¹⁸	96	46 ¹⁹	87
	A/turkey/ Turkey/05/133 (H5N2)	5	47	0	0	63	95 ²⁰	95	100 ²¹	100	46	75 ²⁰	96	58 ²¹	92

Примечание. Цифры от 1 до 21 означают достоверные отличия показателей антител. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – p < 0,05; 2 – p < 0,05; 3 – p < 0,01; 4 – p < 0,01; 5 – p < 0,01; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,05; 8 – p < 0,05; 9 – p < 0,01; 10 – p < 0,05; 11 – p < 0,01; 12 – p < 0,01; 13 – p < 0,05; 14 – p < 0,05; 15 – p < 0,01; 16 – p < 0,05; 17 – p < 0,01; 18 – p < 0,05; 19 – p < 0,05; 20 – p < 0,05; 21 – p < 0,01.
* – см. примечание к таблице 1.

Note. Numbers 1 to 21 show significance levels for the differences in antibody GMTs. The differences are listed pairwise for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – p < 0,05; 2 – p < 0,05; 3 – p < 0,01; 4 – p < 0,01; 5 – p < 0,01; 6 – p < 0,01; 7 – p < 0,05; 8 – p < 0,05; 9 – p < 0,01; 10 – p < 0,05; 11 – p < 0,01; 12 – p < 0,01; 13 – p < 0,05; 14 – p < 0,05; 15 – p < 0,01; 16 – p < 0,05; 17 – p < 0,01; 18 – p < 0,05; 19 – p < 0,05; 20 – p < 0,05; 21 – p < 0,01.
* – As in Table 1.

ТАБЛИЦА 3. ИНТЕНСИВНОСТЬ ПРОДУКЦИИ СЫВОРОТОЧНЫХ IgA- И IgG-АНТИТЕЛ У ВОЛОНТЕРОВ, ПРИВИТЫХ ИГВ H5N1
TABLE 3. INTENSITY OF SERUM IgA AND IgG ANTIBODIES PRODUCTION IN VOLUNTEERS VACCINATED WITH IIV H5N1

Лабораторный тест и антитела Laboratory test and antibodies	Группа привитых* Group of volunteers	Показатели продукции антител (АТ) к вакцинному вирусу NIBRG-23 (H5N1) Production of antibodies (Ab) to vaccine virus NIBRG-23 (H5N1)				
		СГТ** АТ Antibody GMTs				Кратность прироста СГТ АТ Antibody GMT, fold changes
		Д0*** D0	Д7*** D7	Д28*** D28	Д56*** D56	
ИФА – IgA IgA ELISA	ИГВ H5N1 (N = 24) IIV H5N1 (N = 24)	7	21 ¹	21 ²	25 ³	3,0 3,6
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N = 19) LAIV H5N2 + IIV H5N1 (N = 19)	6	55 ¹	69 ²	60 ³	9,2 11,5 10,0
ИФА – IgG IgG ELISA	ИГВ H5N1 (N = 24) IIV H5N1 (N = 24)	170 ⁴	290 ⁵	490 ⁶	633 ⁷	1,7 2,9 3,7
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 (N = 19) LAIV H5N2 + IIV H5N1 (N = 19)	335 ⁴	745 ⁵	1485 ⁶	1285 ⁷	2,2 4,4 3,8

Примечание. Цифры 1-12 означают достоверные отличия СГТ антител. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – $p < 0,01$; 2 – $p < 0,01$; 3 – $p < 0,01$; 4 – $p < 0,01$; 5 – $p < 0,01$; 6 – $p < 0,01$; 7 – $p < 0,01$; 8 – $p < 0,05$; 9 – $p < 0,05$; 10 – $p < 0,001$; 11 – $p < 0,01$; 12 – $p < 0,01$.

* – ИГВ H5N1 – привитые только этой вакциной; ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 – ранее праймированные ЖГВ H5N2 с последующей (через 1,5 года) прививкой ИГВ H5N1.

** – см. примечание к таблице 1.

Note. Numbers 1 to 12 show significance levels for the differences in antibody GMTs. The differences are listed as pairs for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – $p < 0,01$; 2 – $p < 0,01$; 3 – $p < 0,01$; 4 – $p < 0,01$; 5 – $p < 0,01$; 6 – $p < 0,01$; 7 – $p < 0,01$; 8 – $p < 0,05$; 9 – $p < 0,05$; 10 – $p < 0,001$; 11 – $p < 0,01$; 12 – $p < 0,01$.

* – IIV H5N1 – vaccinated with IIV H5N1 vaccine only; LAIV + IIV H5N2 H5N1 – priming with LAIV H5N2 followed by (in 1.5 years) IIV H5N1 vaccination.

** and *** – as in Table 1.

ТАБЛИЦА 4. АВИДНОСТЬ СЫВОРОТОЧНЫХ (IgA И IgG) АНТИТЕЛ (ИФА) К ВАКЦИННОМУ ШТАММУ NIBRG-23 H5N1 У ВОЛОНТЕРОВ, ПРИВИТЫХ ИГВ H5N1

TABLE 4. AVIDITY OF SERUM IgA AND IgG ANTIBODIES TO VACCINE STRAIN NIBRG-23 H5N1 IN VOLUNTEERS VACCINATED WITH H5N1 IIV (ELISA TESTING)

Лабораторный тест и антитела Laboratory test and antibodies	Группа привитых Group of volunteers	Число лиц с конверсиями антител к вакцинному штамму Number of persons with Ab conversions to the vaccine strain	Из них с достоверным увеличением индекса авидности антител (ИААТ**) Per cent persons with significant (> 15%) increases in AI values	Средние значения ИААТ Arithmetic mean AI		
				D0*** D0	D7*** D7	D28*** D28
IgA	ИГВ H5N1* IIV H5N1	16	0	77,4	83,3	77,9
	ЖГВ H5N2*+ ИГВ H5N1 LAIVH5N2 + IIV H5N1	17	7 (41,2%)	72,7	86,4	84,9
IgG	ИГВ H5N1 IIV H5N1	17	3 (17,6%) ¹	78,3	78,3	77,9 ³
	ЖГВ H5N2 + ИГВ H5N1 LAIVH5N2 + IIV H5N1	11	6 (54,5%) ¹	76,2 ²	86,2	90,6 ^{2,3}

Примечание. Цифры 1-3 означают наличие статистически значимых отличий. Различия указаны попарно для данных из разных групп, обозначенных одинаковыми цифрами: 1 – $p < 0,05$; 2 – $p < 0,05$; 3 – $p < 0,05$.

* – см. примечание к таблице 3.

** – ИИАТ вычисляется как отношение оптической плотности в пробе до добавления мочевины к оптической плотности в той же пробе после добавления мочевины. Достоверным считается увеличение ИИАТ на 15 и более процентов.

*** – см. примечание к таблице 1.

Note. Numbers 1 to 3 indicate significance levels for the differences obtained. The differences are listed as pairs for the data from different groups denoted by the same numbers: 1 – $p < 0.05$; 2 – $p < 0.05$; 3 – $p < 0.05$.

* – as in Table 3.

** – AI values were calculated as a ratio of OD value for a native sample to OD of this sample after addition of urea. Increase in AI by 15% or more was considered significant.

*** – as in Table 1.

к праймирующему и бустирующему вирусам оказались достоверно выше у праймированных волонтеров по сравнению с непраймированными. Это касалось СГТ вируснейтрализующих антител к вирусу А (H5N2) – таблица 1, а также сывороточных IgG антител к вирусу А (H5N1) – таблица 3.

Второй факт – по данным всех тестов праймирование людей ЖГВ H5N2 способствовало резкому ускорению (D7) и усилению (D28, D56) продукции антител. Об этом свидетельствуют сравнительные сведения о динамике СГТ антител в опытной и контрольной группах волонтеров (табл. 1, 3). Бустированный иммунный ответ, выраженный в увеличении числа конверсий антител, наблюдался не только к вакцинному вирусу А (H5N1), но и к другим штаммам: иному клайду вируса А (H5N1) А/Индонезия/05/2005 (H5N1), к праймирующему вирусу А/индюк/Турция/05/133(H5N2) и к вирусу того же подтипа, но выделенного от водоплавающей птицы,

то есть А/утка/Потсдам/86/133(H5N2) – таблица 2. Таким образом, у праймированных волонтеров имел место бустированный гуморальный иммунный ответ и ко всем изученным гетерологичным штаммам с общим вакцинным вирусом гемагглютинином Н5. Повторная иммунизация ИГВ H5N1 праймированных лиц, в отличие от непраймированных, весьма слабо или совсем не усиливала продукцию всех типов антител – таблицы 1, 3.

Третий факт – наличие диссонанса между довольно слабым иммунным ответом (РТГА и РМН) волонтеров на праймирование ЖГВ H5N2 в 2012 г. и очень сильным бустирующим эффектом в продукции этих антител на прививку ИГВ H5N1 в 2014 г. (табл. 1 и 2). Проведенный дополнительный анализ показал полное отсутствие связи между иммунными ответами на праймирующий вирус А (H5N2) и бустирующий вирус А (H5N1). Так, по данным РТГА, из 8 волонтеров с конверсиями антител на ЖГВ H5N2 в 2012 г., от-

ветили в 2014 г. конверсиями антител на двойную прививку ИГВ H5N1 7 человек (85,5%), а из 11 лиц с отсутствием иммунных реакций на ЖГВ H5N2 у 8 (72,2%) наблюдались конверсии антител на ИГВ H5N1 в 2014 г. ($p > 0,05$). В отношении вируснейтрализующих антител получены аналогичные результаты: соответственно, 9 из 9 волонтеров (100%) и 9 из 10 волонтеров (90%) — $p > 0,05$.

Таблица 4 содержит сведения об avidности сывороточных IgA- и IgG-антител у тех же праймированных и непраймированных волонтеров. Эти результаты свидетельствуют, что праймирование ЖГВ H5N2 активнее повышало avidность обоих классов антител к вакцинному вирусу А (H5N1).

В отличие от данных о гуморальном иммунном ответе праймированных и непраймированных лиц, средние арифметические поствакцинальные (D28) уровни CD8⁺, CD8⁺ Tcm и CD8⁺ Tem T-клеток иммунологической памяти к вакцинному вирусу А (H5N1) у этих групп людей не отличались: соответственно, 2,22 и 2,05% для CD8⁺; 1,79 и 1,48% для CD8⁺ Tcm и 3,82 и 3,83% для CD8⁺ Tem ($p > 0,05$). Однако, такие отличия отмечены в предвакцинальных уровнях (D0): соответственно, CD8⁺ — 2,49 и 1,30 ($p < 0,01$) CD8⁺ Tcm — 1,44 и 0,86 ($p < 0,05$) и CD8⁺ Tem — 3,05 и 2,23 ($p < 0,01$).

Обсуждение

Целью любой вакцинации является индукция у людей долговременной иммунологической памяти. Эту же цель преследует и комбинационная вакцинация — образование пулов долгоживущих Т- и В-клеток памяти к бустирующему вирусу с помощью предварительного введения праймирующей вакцины [15].

В настоящей работе способность праймирующей ЖГВ H5N2 индуцировать иммунологическую память к бустирующей ИГВ H5N1 оценивали по ее пяти классическим характеристикам, а именно: скорость формирования — по состоянию иммунитета на раннем сроке (D7) после прививки ИГВ H5N1; интенсивность ее формирования — по уровню иммунитета после первой (D28) и второй (D56) прививок; продолжительность сохранения — по состоянию иммунитета через 1,5 года после праймирования (D0) и по количественным характеристикам иммунитета у праймированных волонтеров после вакцинации, по сравнению с непраймированными (D28 и D56); широта спектра антителообразования — по выявлению антител к гетерологичным вирусам; функциональная активность антител — по показателям avidности.

Обнаружено, что в предвакцинальный период (D0) у волонтеров, праймированных 1,5 года назад ЖГВ H5N2, ряд количественных параметров иммунитета к вирусам А (H5N1) и/или А (H5N2), оказались достоверно выше, чем у непраймированных лиц (табл. 1, 3). Кроме того, по неприведенным в настоящей статье нашим данным, перед вакцинацией ИГВ H5N1 у первых СТГ сывороточных антител к консервативному участку гемагглютинаина (Stalk-домену) вакцинного вируса А (H5N1) был в 2,1 раза выше, чем у вторых. Данные антитела участвуют в нейтрализации вируса гриппа [13]. Все это в совокупности косвенно свидетельствует, что праймирующая прививка ЖГВ H5N2 способствовала установлению долговременной В-клеточной памяти (не менее 1,5 года) не только к гомологичному вакцинному вирусу А (H5N2), но и к гетерологичному потенциально пандемическому вирусу А (H5N1). Обращает на себя внимание факт выявления перед вакцинацией (D0) у некоторых непраймированных людей сывороточных IgA- и IgG-антител, а также цитотоксических Т-клеток иммунологической памяти, специфичных к вирусу А (H5N1). Учитывая, что эти люди не могли контактировать с птичьими вирусами, обнаруженные антитела и клетки можно отнести к перекрестнореагирующим, проявляющим комплементарность к общим для всех подтипов вируса гриппа А антигенным эпитопам. Уровень таких антител и Т-клеток поддерживается контактами (инфекция и вакцинация) с актуальными вирусами подтипов А (H1N1) и А (H3N2).

Установлено (табл. 1-3), что у волонтеров, праймированных в 2012 г. ЖГВ H5N2, даже однократная прививка ИГВ H5N1 оказывала хорошо выраженный бустирующий эффект на развитие гуморального иммунного ответа к вакцинному штамму. Он проявлялся в ускоренной (D7) и усиленной (D28) продукции всех изученных типов антител. Повторная прививка ИГВ H5N1 оказывала либо слабый эффект, либо он вообще отсутствовал. Это свидетельствует о достаточности однократной вакцинации при использовании ИГВ H5N1 в качестве бустирующего препарата. По данным американских авторов, праймирование взрослых людей ЖГВ H5N1 также резко усиливало продукцию антигемагглютинирующий (РТГА) и вируснейтрализующих (РМН) антител на отдаленную (через 5 лет) ревакцинацию ИГВ H5N1 [18].

Показано (табл. 1, 2), что бустирующий эффект ИГВ H5N1 у праймированных ЖГВ H5N2 волонтеров распространился не только на антителогенез к гомологичному вакцинному вирусу

А (H5N1), но и ко всем гетерологичным вирусам с гемагглютинином Н5. Полученные сведения о развитии кроссреактивного иммунного ответа расширяют тактические возможности применения комбинационных схем вакцинации против потенциально пандемических птичьих вирусов гриппа А. Ранее американскими учеными аналогичный кроссреактивный эффект был обнаружен у волонтеров в комбинационной системе праймирующая адъювантная ИГВ H5N3 – бустеруемая субвирионная ИГВ H5N1 [10], а также в форме бустирования иммунного ответа к разным клэйдам вируса А H5N1 с помощью праймирования рекомбинантной вакциной с гемагглютинином Н5 [14].

Главным в применении комбинационной стратегии вакцинации против потенциально пандемических вирусов гриппа А является вопрос об оценке способности праймирующей вакцины успешно индуцировать долговременную В-клеточную иммунологическую память. Если судить об успешности «закладки» в 2012 г. иммунологической памяти по количественным параметрам продукции антигемагглютинирующих (РТГА) или вируснейтрализующих (РМН) антител к праймирующему вирусу А(H5N2), то можно прийти к неправильному выводу о слабости развития этого процесса (табл. 1, 2). Однако мощный бустерирующий эффект, зафиксированный в 2014 г. даже у лиц с отсутствием конверсий антител на праймирование, полностью опровергает этот вывод. На самом деле формирование В-клеточной памяти на праймирование ЖГВ H5N2 было вполне успешным, поскольку по совокупным данным всех иммунологических тестов (РТГА, РМН, ИФА – сывороточные и локальные IgA антитела, вируснейтрализующие Т-клетки памяти) 18 из 19 волонтеров (95%) ответили на ЖГВ тем или иным типом иммунной реакции. Это свидетельствует, что по отдельности РТГА (официально регламентированный тест для оценки иммуногенности гриппозных вакцин) и РМН (наиболее распространенный нерегламентированный тест) не отражают истинную картину формирования у людей В-клеточной иммунологической памяти – одного из важнейших звеньев адаптивного иммунитета. Для этого необходимо ориентироваться на совокупные данные об иммунных ответах на ЖГВ, полученные при анализе разных факторов иммунной защиты: сывороточных и локальных антител, цитотоксических и хелперных Т-клеток иммунологической памяти. Такой подход успешно апробирован нами при оценке иммуногенности отечествен-

ной ЖГВ против других потенциально пандемических вирусов гриппа А [6, 7].

Авидность антител отражает созревание В-клеточной иммунологической памяти к инфекционным агентам. Ранее американскими учеными было показано, что праймирование людей ЖГВ H5N1 приводит к усилению продукции высокоавидных сывороточных антител к вакцинному штамму бустерирующей ИГВ H5N1 [18]. По нашим данным, иммунизация людей сезонными ЖГВ, ЖГВ A/pdm 2009 (H1N1) и ЖГВ H5N2 также повышала авидность локальных IgA-антител [1, 2]. Результаты настоящего исследования (табл. 4) свидетельствуют, что праймирование ЖГВ H5N2 приводило к повышению авидности сывороточных IgA- и IgG-антител к вакцинному штамму ИГВ А(H5N1). Это подтверждает собственные данные о более низкой способности инактивированных гриппозных вакцин, по сравнению с живыми вакцинами, индуцировать высокоавидные сывороточные антитела [5].

Анализ развития Т-клеточного иммунного ответа на ИГВ H5N1 у праймированных и непраймированных ЖГВ H5N2 волонтеров показал парадоксальный эффект. По аналогии с гуморальным иммунным ответом мы ожидали, что поствакцинальная продукция вирусспецифических CD8⁺Т-клеток иммунологической памяти у праймированных будет выше, чем у непраймированных. Однако этого не наблюдалось. Можно предположить, что торможение CD8⁺Т-клеточного иммунного ответа у праймированных волонтеров носит либо компенсаторный характер вследствие резко усиленного гуморального иммунного ответа, либо оно связано с более высоким исходным уровнем этих клеток у праймированных лиц в Д0. Так, статистический анализ полученных результатов показал высокие значения коэффициента Спирмена (от -0,71 до -0,84), отражающие существование четко выраженной обратной зависимости между уровнями CD8⁺, CD8⁺Тсм и CD8⁺Тем Т-клеток перед вакцинацией и достоверным (в 20 и более раз) конверсиями этих клеток после прививки ИГВ H5N1.

В работе американских авторов [15] совершенно справедливо поставлен вопрос о выборе оптимальных сроков между введением праймирующих и бустерирующих вакцин против потенциально пандемических вирусов гриппа А. Это важно с точки зрения развития полноценной поствакцинальной иммунологической памяти на праймирование. Показано, что короткий период (1-3 месяца) между праймирующей и бустерирующей прививками ИГВ не вызывал усиление гуморального иммунного ответа на по-

следнюю [9]. В исследовании по праймированию людей ЖГВ H5N1 с последующим через 5 лет бустированием ИГВ H5N1 приведены убедительные доказательства сохранения поствакцинальной В-клеточной иммунологической памяти к праймирующему вирусу не менее этого срока [18]. Эти данные свидетельствуют, что в стратегическом плане даже очень длительный интервал между праймированием и бустированием вряд ли может отразиться на защитной функции приобретенной В-клеточной памяти. Однако вопрос о сроках существенен с точки зрения тактики вакцинации по следующим соображениям. Проводить массовую вакцинацию людей против потенциально пандемических вирусов гриппа А без возникновения угрожающей ситуации с экономической точки зрения не рентабельно. Обычно между возникновением такой ситуации и полноценным развитием пандемии нового серотипа вируса гриппа А проходит не менее 1-1,5 лет. За этот период времени можно успеть праймировать население ЖГВ в ближайший сезон вакцинации (сентябрь – ноябрь), а на следующий сезон бустировать ИГВ. Поэтому мы считаем выбранный нами период в 1,5 года оптимальным.

Заключение

Обобщая данные, можно отметить следующее:

Двукратная прививка ИГВ H5N1 непримированных лиц слабо стимулировала гуморальный

иммунный ответ к вакцинному штамму. Отдаленное (1,5 года назад) праймирование людей ЖГВ H5N2 резко ускоряло и усиливало продукцию сывороточных антител, даже после однократной вакцинации ИГВ H5N1. Это касалось антител как к вакцинному вирусу А H5N1, так и к гетерологичным штаммам с тем же гемагглютинином. У праймированных лиц IgA- и IgG-антитела к вакцинному штамму обладали более высокой авидностью по сравнению с непримированными. Все эти факты свидетельствуют о том, что отдаленное праймирование людей отечественной ЖГВ H5N2 формирует долговременную В-клеточную иммунологическую память к потенциально пандемическому вирусу А (H5N1). В отдельности данные РТГА и РМН об иммуногенности праймирующей ЖГВ H5N2 не отражали ее истинные свойства по «закладке» В-клеточной памяти. Для правильной оценки этого качества ЖГВ требуется учет совокупных данных комплексного иммунологического обследования прививаемых людей (РТГА⁺РМН⁺ИФА⁺Т-клетки памяти). Оптимальным сроком между праймированием ЖГВ и бустированием ИГВ является 15-18 месяцев. В целом полученные данные обосновывают новое направление в применении ЖГВ для защиты от потенциально пандемических вирусов гриппа А.

Список литературы / References

1. Дони́на С.А., Кореньков Д.А., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Оценка авидности локальных IgA-антител у людей, привитых живой гриппозной вакциной // Медицинская иммунология, 2008. Т. 10, № 4-5. С. 423-430. [Donina S.A., Korenkov D.A., Rudenko L.G., Naikhin A.N. Avidity evaluation of local IgA antibodies in persons immunized with live influenza vaccine. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2008, Vol. 2010, no. 4-5, pp. 423-430. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2008-4-5-423-430.
2. Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Кузнецова С.А., Лосев И.В., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Локальный гуморальный иммунный ответ у больных гриппом людей и лиц, привитых сезонными, пандемической и потенциально пандемической живыми гриппозными вакцинами // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, № 3. С. 37-42. [Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Kuznetsova S.A., Losev I.V., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Local antibody immune responses in influenza patients and persons vaccinated with seasonal, pre-pandemic, and pandemic live attenuated influenza vaccines. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 3, pp. 37-42. (In Russ.)]
3. Лосев И.В., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Ерофеева М.К., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Использование метода оценки поствакцинальной секреции антител В-лимфоцитами *in vitro* для характеристики иммуногенности в клинических испытаниях резервных гриппозных вакцин А (H5N1) и А (H5N2) // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 2. С. 129-138. [Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Erofeeva M.K., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Application of method based on *in vitro* antibody quantification in PBMC supernatant samples for evaluation of A (H5N1) and A (H5N2) potentially pandemic influenza vaccines immunogenicity in clinical

trials. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2016, Vol. 18, no. 2, pp. 129-138. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-2-129-138.

4. Лосев И.В., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Григорьева Е.П., Дорошенко Е.М., Руденко Л.Г., Найхин А.Н. Обнаружение у людей кроссреактивных антител и Т-клеток иммунологической памяти к антропонозным и зоонозным подтипам вируса гриппа А // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 4. С. 347-358. [Losev I.V., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Grigorieva E.P., Doroshenko E.M., Rudenko L.G., Naykhin A.N. Crossreactive antibodies and memory T cells to human and zoonotic influenza A viruses in volunteers. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 4, pp. 347-358. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-4-347-358.

5. Найхин А.Н., Артемьева С.А., Босак Л.В., Каторгина Л.Г. Значение функциональной активности антител в противогриппозном иммунитете // Вестник РАМН, 1995. № 9. С. 32-36. [Naykhin A.N., Artemyeva S.A., Bosak L.V. The value of the functional activity of antibodies in anti-influenza immunity. *Vestnik RAMN = Bulletin of the Russian Academy of Medical Sciences*, 1995, no. 9, pp. 32-36. (In Russ.)]

6. Найхин А.Н., Дони́на С.А., Лосев И.В., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Стукова М.А., Ерофеева М.К., Коншина О.С., Смолоногина Т.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Руденко Л.Г. Гомологичный и гетерологичный гуморальный и Т-клеточный иммунный ответ людей на живые реассортантные гриппозные вакцины А(Н5N2) и А(Н7N3) // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 1. С. 59-70. [Naykhin A.N., Donina S.A., Losev I.V., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Stukova M.A., Erofeeva M.K., Konshina O.S., Smolonogina T.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Rudenko L.G. Homological and heterological antibody and T-cell immune responses to live attenuated influenza vaccine A (H5N2) and A (H7N3). *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 1, pp. 59-70. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-1-59-70.

7. Найхин А.Н., Дони́на С.А., Петухова Г.Д., Кореньков Д.А., Дорошенко Е.М., Григорьева Е.П., Суворова М.А., Руденко Л.Г. Гуморальный и клеточный иммунный ответ у людей к вирусу гриппа А/Калифорния/07/2009 (H1N1) – А(H1N1)pdm2009 // Вопросы вирусологии, 2013. Т. 58, №2. С. 38-42. [Naykhin A.N., Donina S.A., Petukhova G.D., Korenkov D.A., Doroshenko E.M., Grigorieva E.P., Suvorova M.A., Rudenko L.G. Humoral and Cell-mediated Immune Responses in Humans to the A/California/07/2009 (H1N1) Virus, A(H1N1)pdm2009. *Voprosy virusologii = Problems of Virology*, 2013, Vol. 58, no. 2, pp. 38-42. (In Russ.)]

8. Chang H.S., Sack D.A. Development of a novel *in vitro* assay (ALS assay) for evaluation of vaccine-induced antibody secretion from circulating mucosal lymphocytes. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2001, Vol. 8, no. 3, pp. 482-488.

9. Choi Y.S., Baek Y.H., Kang W., Nam S.J., Lee J., You S., Chang D.Y., Youn J.C., Choi Y.K., Shin E.C. Reduced antibody responses to the pandemic (H1N1) 2009 vaccine after recent seasonal influenza vaccination. *Clinical Vaccine Immunology*, 2011, Vol. 18, no. 9, pp. 1519-1523.

10. Goji N.A., Nolan C., Hill H. Immune responses of healthy subjects to a single dose of intramuscular inactivated influenza A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) vaccine after priming with an antigenic variant. *J. Infect. Dis.*, 2008, Vol. 198, no. 5, pp. 635-641.

11. He X.S., Holmes T.H., Zhang C. Cellular immune responses in children and adults receiving inactivated or live attenuated influenza vaccines. *J. Virol.*, 2006, Vol. 80, no. 23, pp. 11756-11766.

12. He X.S., Sasaki S., Narvaez C.F. Plasmablast-derived polyclonal antibody response after influenza vaccination. *Journal of Immunological Methods*, 2011, Vol. 365, no. 1-2, pp. 67-75.

13. Krammer F., Palese P. Influenza virus hemagglutinin stalk-based antibodies and vaccines. *Current Opinion Virology*, 2013, Vol. 3, no. 5, pp. 521-530.

14. Ledgerwood J.E., Wei C.J., Hu Z. DNA priming and influenza vaccine immunogenicity: two phase 1 open label randomised clinical trials. *Lancet Infect. Dis.*, 2011, Vol. 11, no. 12, pp. 916-924.

15. Luke C.J., Subbarao K. Improving pandemic H5N1 influenza vaccines by combining different vaccine platforms. *Expert Rev. Vaccines*, 2014, Vol. 13, no. 7, pp. 873-883.

16. Nicholson K.G., Colegate A.E., Podda A. Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: a randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*, 2001, Vol. 357, no. 9272, pp. 1937-1943.

17. Rowe T., Abernathy R.A., Hu-Primmer J. Detection of antibody to avian influenza A (H5N1) virus in human serum by using a combination of serologic assays. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, Vol 37, no. 4, pp. 937-943.
18. Talaat K.R., Luke C.J., Khurana S. A live attenuated influenza A(H5N1) vaccine induces long-term immunity in the absence of a primary antibody response. *J. Infect. Dis.*, 2014, Vol. 209, no. 12, pp. 1860-1869.
19. WHO global action plan vaccine supply for influenza vaccine. 2006, Geneva, Belgium. WHO/IVB/06.13. HO/ODS/EPR/GIP/2006.1.

Авторы:

Лосев И.В. — научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Донина С.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Петухова Г.Д. — к.б.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Кореньков Д.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Ерофеева М.К. — д.м.н., заведующая лабораторией испытаний новых средств защиты от вирусных инфекций ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Стукова М.А. — ведущий научный сотрудник, лаборатория молекулярной вирусологии и генной инженерии ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа» Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, Россия

Руденко Л.Г. — д.м.н., профессор, руководитель отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Найхин А.Н. — д.м.н., профессор, заведующий лабораторией иммунологии и профилактики вирусных инфекций отдела вирусологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия

Authors:

Losev I.V., Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Donina S.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Petukhova G.D., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Korenkov D.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Erofeeva M.K., PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory for Trials of Novel Antiviral Protective Remedies, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Stukova M.A., Leading Research Associate, Laboratory of Molecular Virology and Genetic Engineering, Research Institute of Influenza, St. Petersburg, Russian Federation

Rudenko L.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation

Naykhin A.N., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Laboratory of Immunology and Prophylaxis of Viral Infections, Department of Virology, Research Institute of Experimental Medicine, North-West Branch, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russian Federation

Поступила 01.12.2016
Отправлена на доработку 13.12.2016
Принята к печати 29.12.2016

Received 01.12.2016
Revision received 13.12.2016
Accepted 29.12.2016

ИНДУКЦИЯ Т-КЛЕТОЧНОГО ИММУННОГО ОТВЕТА У ПАЦИЕНТОВ С ХРОНИЧЕСКИМ ГЕПАТИТОМ С НА ФОНЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДЕНДРИТНЫМИ КЛЕТКАМИ

**Черных Е.Р., Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тихонова М.А.,
Курочкина Ю.Д., Старостина Н.М., Останин А.А.**

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

Резюме. Ключевая роль Т-клеток в элиминации вируса и отсутствие сильного Т-клеточного ответа у больных хроническим гепатитом С (ХГС) позволяет рассматривать активацию антиген-специфических Т-клеток в качестве перспективного подхода к повышению эффективности лечения. Учитывая центральную роль дендритных клеток (ДК) в индукции Т-клеточного ответа, целью исследования явилась оценка влияния иммунотерапии ДК на показатели иммунитета у больных ХГС. Десять пациентов с хронической HCV-инфекцией (генотип 1) были вакцинированы ДК, генерируемыми из моноцитов в присутствии интерферона- α (IFN-ДК) и нагруженными рекомбинантными белками Core (1–120) и NS3 (1192–1457). Вакцинотерапия включала иницирующий (4 вакцинации с недельным интервалом) и поддерживающий (6 вакцинаций с месячным интервалом) курс с последующим периодом 6-месячного наблюдения. Проведение иммунотерапии ДК не сопровождалось развитием тяжелых нежелательных явлений, выраженных поствакцинальных реакций или возрастанием биохимических проявлений активности гепатита. Исследования *ex vivo* показали, что иммунотерапия ДК приводила к индукции выраженного устойчивого иммунного ответа на Core и умеренного ответа на NS3, что проявлялось значимым возрастанием пролиферации и продукции IFN γ при стимуляции МНК Core и усилением продукции IFN γ (при отсутствии достоверного возрастания пролиферативного ответа) при стимуляции МНК NS3. Иммунотерапия ДК также приводила к возрастанию до нормативных значений Кона-индуцированной пролиферации МНК, свидетельствуя о восстановлении митогенной реактивности Т-клеток. В то же время активация Т-клеточного ответа не сопровождалась индукцией антиген-специфических Th2-клеток и не приводила к генерации регуляторных CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Т-клеток. Несмотря на индукцию иммунного ответа, иммунотерапия ДК не сопровождалась значимым снижением виремии. Тем не менее преходящее уменьшение вирусной нагрузки у 4 пациентов и стойкое снижение виремии у двух, а также наличие обратной взаимосвязи между NS3-специфическим пролиферативным ответом и уровнем вирусной нагрузки ($R_s = 0,62$; $p < 0,05$) (на момент завершения 6-месячного наблюдения) указывает на способность антиген-специфических Т-клеток ограничивать репликацию вируса.

Ключевые слова: хронический вирусный гепатит С, антиген-специфический Т-клеточный ответ, Core, NS3, иммунотерапия, дендритные клетки

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Е.Р. Черных, Е.А. Олейник, О.Ю. Леплина,
М.А. Тихонова, Ю.Д. Курочкина, Н.М. Старостина,
А.А. Останин «Индукция Т-клеточного иммунного ответа
у пациентов с хроническим гепатитом С
на фоне иммунотерапии дендритными клетками»
// Медицинская иммунология. 2017. Т. 19, № 4. С. 387-400.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-387-400

© Черных Е.Р. и соавт., 2017

For citation:

E.R. Chernykh, E.A. Oleynik, O.Yu. Leplina, M.A. Tikhonova,
Yu.D. Kurochkina, N.M. Starostina, A.A. Ostanin "Induction of
T-cell immune response in chronic HCV-infected patients with
underlying dendritic cell immunotherapy", *Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya*, 2017, Vol. 19, no. 4,
pp. 387-400. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-387-400

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-387-400

INDUCTION OF T-CELL IMMUNE RESPONSE IN CHRONIC HCV-INFECTED PATIENTS WITH UNDERLYING DENDRITIC CELL IMMUNOTHERAPY

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

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

Abstract. A key role of T cells in viral elimination and absence of strong T cell responses in patients with chronic hepatitis C virus (HCV) infection presumes that activation of antigen-specific T cells may be a promising approach to enhance treatment efficacy. Given the central role of dendritic cells (DCs) in the induction of T cell response, the aim of our study was to evaluate effects of DC immunotherapy upon immunological parameters in chronic HCV infection. Ten patients with chronic hepatitis C (genotype 1) were vaccinated with monocyte-derived DCs, generated in presence of IFN α (IFN-DCs) and pulsed with recombinant HCV Core (1–120) and NS3 (1192–1457) proteins. The vaccination protocol included as initiating procedure (one injection per week, ns = 4) and maintaining treatment (one monthly injection, ns = 6), with subsequent follow up for 6 months. The immunotherapy was not associated with serious adverse events, significant post-vaccination reactions, or increased hepatitis C activity, according to biochemical tests. *Ex vivo* studies have shown that immunotherapy elicited strong and stable immune response to Core and moderate response to NS3 protein, which manifested as a significant increase of MNC proliferation and IFN γ production in response to Core and enhancement of IFN γ production (without higher proliferation rates), in response to NS3. DC immunotherapy also led to increase of ConA-induced MNC proliferation up to normal levels indicating a recovery of mitogenic T cell reactivity. Meanwhile, T cell activation did not elicit antigen-specific Th2 response and expansion of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ regulatory T cells. Despite induced immune response, the immunotherapy with DCs was not accompanied by decreased viremia levels. Nevertheless, a transitory decrease of viral load in four patients and stable decrease of viremia in two patients as well as an inverse correlation between NS3-specific proliferation and viremia ($R_{ss} = 0.62$; $p < 0.05$) by the end of 6-month follow-up indicated that the antigen-specific T cells may have a potential to control viral replication.

Keywords: chronic HCV infection, antigen-specific T cell response, core antigen, NS3 antigen, immunotherapy, dendritic cells

Введение

Хронический вирусный гепатит С (ХГС) представляет большую проблему для здравоохранения во всем мире, поскольку характеризуется широкой распространенностью, существенно повышает риск развития цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы и является одной из ведущих причин трансплантации печени [20, 23]. Современная терапия ХГС, включающая препараты пэгилированного интерферона-альфа и рибавирина [11], является дорогостоящей, неспецифичной, сопровождается частым развитием серьезных осложнений и эффективна только у 50% пациентов с генотипом 1 вируса гепатита С (HCV) [21]. Прорыв в лечении ХГС связывают с разработкой и внедрением таргетных противовирусных препаратов, однако и этот подход ограничен генотипом вируса и высокой стоимостью [29].

Известно, что элиминация вируса требует активации сильного кросс-реактивного иммунно-

го ответа вирус-специфических CD4⁺ и CD8⁺Т-лимфоцитов. Выраженный и устойчивый ответ CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток на вирусные белки способствует спонтанному выздоровлению при острой инфекции, тогда как исход в хронизацию и хроническое течение гепатита С сопряжены со слабым преходящим ответом CD4⁺ и CD8⁺Т-клеток, характеризующимся узкой антигенной специфичностью [14, 26, 30]. Кроме того, сильный Т-клеточный ответ повышает эффективность противовирусной терапии интерферонами с рибавирином [4, 15]. Поэтому, наряду с таргетной противовирусной терапией, повышение эффективности лечения ХГС связывают с разработкой подходов, направленных на активацию противовирусного Т-клеточного ответа.

Ведущая роль в запуске противовирусного Т-клеточного ответа отводится дендритным клеткам (ДК), способным эффективно презентировать антигены, активировать наивные Т-клетки и индуцировать эффекторные Т-клетки [7].

Многочисленные исследования выявили нарушения ДК при ХГС, проявляющиеся задержкой созревания, изменением продукции цитокинов и снижением аллостимуляторной активности ДК [2, 28]. С этой точки зрения индукция сильного иммунного ответа с помощью генерированных *ex vivo* ДК рассматривается в качестве новой стратегии создания лечебных вакцин при ХГС [35].

Учитывая низкое содержание ДК в периферической крови, достаточное для клинических исследований количество ДК обычно получают путем генерации ДК из моноцитов [31]. *In vitro* дифференцировка моноцитов в ДК отражает физиологические процессы развития ДК из моноцитарных предшественников *in vivo* [25]. Кроме того, дифференцированные из моноцитарных предшественников ДК могут быть в меньшей степени иммунокомпрометированы вирусом.

Учитывая вышесказанное, в рамках научного поискового исследования было изучено влияние иммунотерапии ДК, генерируемыми из моноцитов и нагруженными вирусными антигенами, на показатели иммунитета у пациентов с хронической HCV-инфекцией.

Клеточной платформой ДК-вакцин служили ДК, генерированные из моноцитов в присутствии гранулоцитарно-макрофагального колоние-стимулирующего фактора (GM-CSF) и интерферона- α (IFN-ДК). По сравнению с традиционно генерируемыми ДК, которые получают в присутствии GM-CSF и интерлейкина-4 [31], IFN-ДК характеризуются более высокой миграционной активностью; более эффективно индуцируют генерацию цитотоксических Т-клеток, распознающих вирусные антигены; обладают свойствами NK-клеток, а также характеризуются более высокой продукцией IFN α [9, 16, 19, 27].

В качестве вирусных антигенов предполагалось использование структурных (Core) и неструктурных (NS3) рекомбинантных белков, которые содержат высокоиммуногенные пептиды и индуцируют Т-клеточный иммунный ответ, включая активацию Th1-клеток и генерацию цитотоксических Т-лимфоцитов (ЦТЛ) [12, 24]. Учитывая, что полноразмерные HCV белки обладают иммуносупрессивной активностью [17, 34], для нагрузки ДК использовались усеченные фрагменты Core (1–120) и NS3 (1192–1457) пептидов. Указанные рекомбинантные белки, согласно полученным нами ранее данным, не оказывали супрессорного эффекта на экспрессию поверхностных маркеров, продукцию цитокинов, а также аллостимуляторную активность IFN-ДК, и их способность стимулировать продукцию Th1- и Th2-цитокинов при нагрузке ДК [1].

Материалы и методы

Рекрутирование пациентов с ХГС 1-го генотипа проводили из числа пациентов, находившихся на обследовании и лечении в клинике иммунопатологии НИИФКИ в период с мая 2015 г. по ноябрь 2016 г. Клиническое исследование проводили в дизайне открытого проспективного пилотного исследования с контролем «до-после» согласно протоколу, утвержденному решением Ученого Совета и одобренному локальным этическим комитетом. Все манипуляции по получению и культивированию клеток проводили в условиях специализированной лаборатории, лицензированной для работы с клетками (лицензия на трансплантацию костного мозга и гемопоэтических стволовых клеток, ФС-54-01-002049). Включение в исследование пациентов проводилось только после подписания письменного информированного согласия.

Критериями включения служили: наличие вируса гепатита С, подтвержденного анализом ПЦР на РНК вируса, хроническая форма заболевания, умеренная вирусная нагрузка — РНК $\geq 10^4$ МЕ/мл, минимальная или средняя степень активности гепатита по уровню трансаминаз крови, отсутствие трансформации в цирроз — (фиброз 0–III по шкале METAVIR).

К критериям невключения относили несоответствие критериям включения; наличие выраженной иммунокомпрометации, обусловленной иммуносупрессивной терапией или сопутствующей ВИЧ-инфекцией; участие пациента в другом клиническом исследовании; наличие выраженной хронической декомпенсированной сердечно-сосудистой, дыхательной, печеночной, почечной недостаточности, декомпенсированного сахарного диабета; декомпенсированные заболевания щитовидной железы, злокачественные заболевания; болезни крови; психические нарушения; беременность.

Для получения ДК из периферической крови выделяли мононуклеарные клетки (МНК) методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла-верографина. Фракцию прилипающих к пластику МНК культивировали в пластиковых флаконах (BD Biosciences Falcon, UK) в течение 3 сут. в среде RPMI-1640 (Sigma) в присутствии GM-CSF (Sigma) 40 нг/мл и IFN α 1000 ЕД/мл (Роферон-А, Roche, Швейцария). Нагрузку антигенами осуществляли путем инкубации ДК в течение 1 часа с рекомбинантными протеинами, кодируемыми фрагментами генов иммунодоминантных районов белков Core (1–120) и NS3 (1192–1457) HCV генотипа 1b, полученных в ла-

боратории рекомбинантных белков ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск) в дозе 5 мкг/мл. Нагруженные антигеном ДК индуцировали к созреванию путем 24-часового культивирования с азоксимер бромидом (Полиоксидоний, Петровакс Фарм, Москва) в дозе 2 нг/мл. После дозревания клетки отмывали, аликвотировали по 5×10^6 /пробирку, криоконсервировали и хранили в морозильной камере (Sanyo Ultra Low) при -80°C до последующего использования.

Введение аутологических ДК нагруженных вирусными антигенами включало два курса вакцинации. Первый курс состоял из 4 подкожных инъекций ДК (в дозе 5×10^6 клеток), нагруженных рекомбинантным Core и NS3 антигенами, с недельным интервалом (общей продолжительностью 1 мес.). Второй курс проводился после завершения первого и состоял из 6 вакцинаций с кратностью 1 раз в месяц (общей продолжительностью 6 мес.). В качестве адьюванта использовали рекомбинантный IL-2 (Ронколейкин, «Биотех», Санкт-Петербург), который вводили подкожно в дозе 250 000 ЕД. Вакцинации проводили внутрикожно в область плеча. Препарат IL-2 вводили аналогичным образом рядом с местом введения вакцины.

Обследование пациентов проводили до начала лечения (I); через 1 месяц после инициирующего курса (II); через 1 месяц после поддерживающего курса (III) иммунотерапии, а также после 6-месячного наблюдения (IV). Оценка безопасности включала анализ тяжелых нежелательных явлений, а также местных и системных поствакцинальных реакций и основывалась на клинических и лабораторных методах обследования.

Антиген-специфический Т-клеточный ответ оценивали по уровню пролиферации МНК в ответ на стимуляцию Core и NS3 антигенами (5 мкг/мл) в 7-суточных культурах. Неспецифический ответ оценивали в 3-суточных культурах по уровню пролиферации МНК в ответ на стимуляцию конканавалином А (КонаА, 15 мкг/мл; Sigma). Пролиферативный ответ оценивали радиометрически по включению H3-тимидина, вносимого в лунки за 18 ч до конца культивирования в дозе 1 мккю/лунку. Th1-/Th2-ответ оценивали по продукции цитокинов (IFN γ , IL-4, IL-6) в 48-час. супернатантах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами (5 мкг/мл) методом иммуоферментного анализа с использованием коммерческих тест-систем («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Содержание регуляторных Т-клеток определяли методом проточной цитометрии по количеству CD4⁺CD25⁺CD127⁺ Т-клеток в гейте CD4⁺ лимфоцитов, исполь-

зуя коммерческий коктейль моноклональных анти-CD4 (FITC), анти-CD25 (PE-Cy7), анти-CD127 (Alexa Fluor 647) антител, в соответствии с инструкцией производителя (BD Biosciences, США). Исследование проводили по общепринятой методике с использованием параметров прямого и бокового светорассеяния и флюоресценции по каналам FL-1 (FITC), FL-3(PE-Cy7), FL-4 (Alexa Fluor 647) (BD FACSCalibur, США). В тексте относительное содержание анализируемых субпопуляций представлено в виде процента от CD4⁺Т-клеток.

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Для оценки статистической значимости различий сравниваемых выборок использовали непараметрические критерии Манна–Уитни. Различия считали значимыми при уровне $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили методом ранговой корреляции Спирмена (Rs).

Результаты

В исследование были включены 10 пациентов (8 женщин и 2 мужчин) в возрасте от 30 до 59 лет (табл. 1). У пяти пациентов вирусная нагрузка – РНК составляла 10^4 МЕ/мл, у четырех пациентов – 10^5 МЕ/мл и у одного пациента – 10^6 МЕ/мл. Степень активности вирусного гепатита по показателям трансаминаз варьировала от минимальной до умеренной, степень фиброза – от 0 до III по шкале METAVIR.

Вакцинация аутологичными IFN-ДК, нагруженными Core и NS3 вирусными антигенами, характеризовалась хорошей переносимостью. Ни у одного из пациентов иммунотерапия не была прекращена в связи с развитием серьезных нежелательных явлений, включая обострение хронических заболеваний и ситуаций, требующих госпитализации пациента. Введение ДК вакцин не влияло на показатели крови и не вызывало токсических и воспалительных реакций, а также нарастания биохимических проявлений активности гепатита (табл. 2).

Местные поствакцинальные реакции в виде покраснения, припухлости, зуда и болезненности в месте введения вакцины регистрировались в 37,5–80% случаев (табл. 3) и были в первую очередь обусловлены подкожным введением Ронколейкина в качестве адьюванта. Системные реакции в виде озноба, субфебрильной лихорадки, головной боли и миалгии отмечались в 6,6–32,5% случаев. Поствакцинальные реакции купировались самостоятельно в течение 24–48 ч.

ТАБЛИЦА 1. ХАРАКТЕРИСТИКА БОЛЬНЫХ ХГС

TABLE 1. CHARACTERISTIC OF THE PATIENTS WITH HCV INFECTION

Пациент Patient	Пол Sex	Возраст Age	АСТ (ЕД/л) ASAT (U/L)	АЛТ (ЕД/л) ALAT (U/L)	Вирусная нагрузка (МЕ/мл) Viral load (IU/mL)	Степень фиброза печени по шкале METAVIR Liver fibrosis (METAVIR Score)
1. Пациент М.А. Patient M.A.	жен. fem.	31	42	31	$5,6 \times 10^4$	II
2. Пациент Ю.Е. Patient Yu.E.	жен. fem.	30	40	32	$3,2 \times 10^4$	I
3. Пациент Ш.Н. Patient Sh.N.	жен. fem.	59	65	69	$4,8 \times 10^4$	II
4. Пациент М.Н. Patient M.N.	жен. fem.	35	21	25	$3,5 \times 10^4$	0
5. Пациент М.Е. Patient M.E.	жен. fem.	45	75	37	$9,9 \times 10^5$	I-II
6. Пациент Н.А. Patient N.A.	муж. masc.	32	118	68	$9,4 \times 10^5$	II-III
7. Пациент Б.О. Patient B.O.	жен. fem.	57	22	24	$1,8 \times 10^6$	0-I
8. Пациент Ш.И. Patient Sh.I.	жен. fem..	31	90	45	$1,9 \times 10^5$	I
9. Пациент Ш.О. Patient Sh.O.	жен. fem.	37	22	22	$2,2 \times 10^5$	0-I
10. Пациент М.Д. Patient M.D.	муж. masc.	36	20	24	$1,3 \times 10^4$	I

Для оценки иммуностимулирующего эффекта оценивали влияние вакцинации на индукцию специфического иммунного ответа, определяемого по пролиферации и продукции Th1 (IFN γ) и Th2 (IL-4, IL-6) цитокинов в культурах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами. Кроме того, оценивали эффект вакцинации на пролиферацию Т-клеток в ответ на стимуляцию конканавалином А (неспецифическая, митогенная реактивность) и генерацию регуляторных Т-клеток (CD4⁺CD25⁺CD127⁻Treg).

Перед началом терапии МНК HCV-позитивных пациентов слабо отвечали пролиферацией на стимуляцию вирусными антигенами (табл. 4). Медианное значение индекса влияния Core (ИВ_{CORE}) составляло 1,4 расч. ед. Наличие антиген-специфического ответа (ИВ > 2,0) выявлялось у 4 из 10 (40%) пациентов.

После иницирующего курса регистрировалось значимое усиление пролиферативного ответа на Core и возрастание ИВ_{CORE} до 5,2 расч. ед. К этому моменту наличие Core-специфического ответа (ИВ > 2,0) выявлялось у 8 из 10 пациентов. После завершения поддерживающего курса вакциноотерапии ИВ_{CORE} достигал 7,8 расч. ед. и наличие Core-специфического ответа реги-

стрировалось у всех 10 пациентов. Спустя период последующего 6-месячного наблюдения пролиферативный ответ на Core продолжал нарастать, тогда как ИВ_{CORE} в силу более высокой спонтанной пролиферации незначительно снижался. Тем не менее и в этом случае ИВ_{CORE} 3-кратно превышал исходные значения.

Медиана индекса влияния NS3 МНК (ИВ_{NS3}) перед началом вакциноотерапии составляла 2,5 расч. ед., и наличие NS3-специфического ответа (ИВ_{NS3} > 2,0) выявлялось у 5 из 10 пациентов. После иницирующего курса вакциноотерапии отмечалось умеренное возрастание ИВ_{NS3} до 3,3 расч. ед., которое сохранялось после поддерживающего курса и 6-месячного периода наблюдения. Тем не менее возрастание пролиферативного ответа на NS3 было умеренно выраженным и статистически незначимым. При индивидуальном анализе усиление NS3-индуцированной пролиферации МНК после иницирующего курса отмечалось у 7 из 10 пациентов, было нестойким и сохранялось при последующих обследованиях только у 2 пациентов. У трех из 10 пациентов возрастания NS3-специфического ответа после иницирующего курса не наблюдалось. Индукция NS3-специфического ответа у этих больных

ТАБЛИЦА 2. ВЛИЯНИЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК НА ПОКАЗАТЕЛИ КРОВИ БОЛЬНЫХ ХГС

TABLE 2. THE EFFECT OF DC IMMUNOTHERAPY ON THE BLOOD TESTS OF PATIENTS WITH HCV INFECTION

	До вакцино- терапии Before vaccination	После иницирующего курса After initiating course	После поддерживающего курса After maintenance course	Через 6 месяцев наблюдения After 6 months of follow up
АЛТ ALT (U/L)	41 (22-75)	28 (22-61)	43 (21-67)	32,5 (18,4-63)
АСТ AST (U/L)	31 (24-45)	26 (24-44)	32 (26-45)	30,2 (23-38)
ГГТП GGT (U/L)	19 (17-34)	21 (16-27)	17 (15-27)	21 (15-50)
Билирубин общий Total bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	13,3 (12-20)	9,5 (6,7-13)	8,3 (5-13,1)	8,8 (6-11,7)
Билирубин прямой Conjugated bilirubin ($\mu\text{mol/L}$)	3,2 (2,9-5)	2,4 (1,6-3,6)	2,3 (1,6-3,3)	3,2 (2,4-3,8)
Лейкоциты Leukocytes ($\times 10^9/\text{L}$)	5,3 (4,9-5,5)	5,7 (5-6,1)	5,0 (4,8-5,4)	5,2 (4,8-6,1)
Эритроциты Erythrocytes ($\times 10^{12}/\text{L}$)	4,8 (4,6-5)	4,5 (4,3-4,7)	4,8 (4,7-5)	4,7 (4,6-5,2)
Гемоглобин Hemoglobin (g/L)	143 (131-152)	127 (124-142)	137 (121-143)	135 (121-150)
Тромбоциты Platelets ($\times 10^9/\text{L}$)	232 (211-278)	239 (217-263)	215 (189-250)	230 (188-265)
Лимфоциты Lymphocytes (%)	37,5 (34-40)	37 (36-40)	37,5 (35-39)	38,5 (37-40)
СОЭ ESR (mm/h)	7,5 (5-25)	14 (6-21)	8 (6-16)	8,5 (5-12)

Примечание. Данные представлены в виде медианы и интерквартильных диапазонов (в скобках).

Note. The data are presented as median and interquartile range (in brackets).

регистрировалась позже — после поддерживающего курса (2 пациента) или через 6 месяцев после завершения терапии (1 пациент). Таким образом, вакцинотерапия приводила к индукции выраженного и стойкого пролиферативного ответа МНК на Core и умеренному, преходящему усилению пролиферативного ответа на NS3.

Анализ митогенной реактивности МНК больных ХГС показал (табл. 5), что до начала иммунотерапии пролиферативный ответ МНК больных на Кон-А был в 2 раза ниже, чем ответ МНК здоровых доноров — 10699 (2577-15200) против 24151 (8345-28073) имп/мин соответственно ($p_U < 0,05$).

После иницирующего курса иммунотерапии интенсивность КонА-стимулированной пролиферации и индекс влияния КонА достоверно возрастали и достигали нормативных значений и сохранялись в пределах нормативного диапазона на момент завершения поддерживающего курса, а также через 6 месяцев после окончания лечения.

Причем интенсивность КонА-стимулированной пролиферации через 6 месяцев после завершения терапии превосходила уровень ответа после иницирующего ($p_{US} = 0,019$) и поддерживающего ($p_{US} = 0,034$) курса. Следует отметить, что до начала иммунотерапии (на фоне низкой митогенной реактивности) ответ на КонА значимо коррелировал с уровнем NS3- ($R_{ss} = 0,73$; $ps = 0,02$; $ns = 10$) и Core-специфической ($R_{ss} = 0,88$, $ps = 0,001$; $ns = 10$) пролиферации. В то же время после завершения поддерживающего курса вакцинации эта зависимость существенно ослабевала ($R_{ss} = 0,44$; $ps = 0,2$ и $R_{ss} = 0,51$, $ps = 0,13$; $ns = 10$). Таким образом, хотя индукция устойчивого ответа на Core и преходящего ответа на NS3 в процессе иммунотерапии происходила на фоне восстановления исходно сниженной митогенной реактивности Т-клеток, отсутствие значимой корреляции между ответом на HCV антигена и КонА указывало на то, что усиление

ТАБЛИЦА 3. ПОСТВАКЦИНАЛЬНЫЕ РЕАКЦИИ В ДИНАМИКЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК

TABLE 3. POSTVACCINAL REACTIONS IN DYNAMICS OF DC IMMUNOTHERAPY

Тип реакций Type of reactions	Частота реакций (n, %) в динамике инициирующего курса Frequency of reactions (n, %) during the initiating course	Частота реакций (n, %) в динамике поддерживающего курса The frequency of reactions (n, %) during the maintenance course
Локальные реакции Local reactions		
Покраснение Redness	24/40 (60%)	43/60 (71,6%)
Болезненность Painfulness	32/40 (80%)	42/60 (70%)
Зуд Itch	15/40 (37,5%)	24/60 (40%)
Системные реакции Systemic reactions		
Озноб Chills	9/40 (22,5%)	7/60 (11,6%)
Субфебрилитет Low grade fever	13/40 (32,5%)	7/60 (11,6%)
Головная боль Headache	10/40 (25%)	4/60 (6,6%)
Миалгия Myalgia	10/40 (25%)	9/60 (15%)

Примечание. Данные представлены в виде отношения случаев поствакцинальных реакций к общему числу вакцинаций в динамике иницирующего и поддерживающего курса.

Note. The data are presented as the numbers of postvaccinal reactions to the total vaccination numbers in the course of initiating and maintenance courses.

антиген-специфического ответа не было связано исключительно с неспецифической активацией Т-клеток.

Чтобы проанализировать, какой тип антиген-специфических Т-хелперных клеток активировался в процессе вакциноотерапии, оценивали продукцию $IFN\gamma$ и IL-4/IL-6 в культурах МНК, стимулированных Core или NS3 антигенами. Как видно из данных рисунка 1 (А, Б), исходно (до терапии) стимуляция МНК Core или NS3 антигеном слабо индуцировала продукцию $IFN\gamma$. Медианные значения IB_{CORE} и IB_{NS3} составляли, соответственно, 1,6 и 2,1 расч. ед. На фоне вакциноотерапии наблюдалось умеренное усиление Core-индуцированной продукции $IFN\gamma$ и IB_{CORE} (на уровне тренда) после иницирующего курса и выраженное достоверное возрастание этих показателей после поддерживающего курса и последующего 6-месячного наблюдения. Таким образом, вакциноотерапия ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами индуцировала антиген-специфический Th1-ответ, который четко проявлялся после поддерживающего курса вакцинаций и сохранялся через 6 месяцев наблюдения.

Исследование антиген-специфической продукции IL-4 показало, что исходно МНК больных не отвечали продукцией IL-4 в ответ на стимуляцию вирусными антигенами. Вакциноотерапия не сопровождалась усилением продукции IL-4 в ответ на стимуляции Core или NS3 после иницирующего и поддерживающего курсов вакцинаций, а также 6-месячного периода наблюдения (рис. 1В, Г). Таким образом, вакцинация ДК нагруженными Core и NS3 антигенами не индуцировала антиген-специфический Th2-ответ. Поскольку IL-4 продуцировался в культурах МНК в достаточно низких концентрациях, параллельно была исследована антиген-специфическая продукция IL-6 (рис. 1В, Г), который секретируется Th2-клетками в значительно более высоких концентрациях. Продукцию IL-6 оценивали в период наибольшей выраженности антиген-специфической пролиферации и продукции $IFN\gamma$, т.е. после поддерживающего курса вакцинаций и последующего 6-месячного наблюдения. МНК больных спонтанно продуцировали достаточно высокие концентрации IL-6 – 369 (201–533) пг/мл после поддерживающего курса иммунотерапии и 279 (200–387) пг/мл через 6 месяцев последую-

ТАБЛИЦА 4. ПРОЛИФЕРАТИВНЫЙ ОТВЕТ МНК БОЛЬНЫХ ХГС НА CORE И NS3 АНТИГЕНЫ В ДИНАМИКЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК

TABLE 4. PROLIFERATIVE RESPONSE OF MNC FROM HCV-INFECTED PATIENTS TO CORE AND NS3 ANTIGENS IN THE COURSE OF DC IMMUNOTHERAPY

		До вакцино- терапии Before vaccination	После инициирующего курса After initiating course	После поддерживаю- щего курса After maintenance course	Через 6 месяцев наблюдения After 6 months of follow up
Core	Пролиферация (имп/мин) Proliferation (cpm)	566 (285-1090)	2065 (605-2519) $P_{US} = 0,034$	3875 (2504-7263) $P_{US} = 0,0005$	5359 (1515-5576) $P_{US} = 0,0019$
	Индекс влияния (ИБ, расч. ед) Influence index (estim. units)	1,4 (1-4,9)	5,2 (2,3-11,5) $P_{US} = 0,019$	7,8 (5,4-10,6) $P_{US} = 0,002$	5,0 (1,8-25,2) $P_{US} = 0,004$
	Количество пациен- тов с ИВ > 2,0 Number of patients showing effect index > 2,0	4/10	8/10	10/10	7/10
NS3	Пролиферация (имп/мин) Proliferation (cpm)	1316 (589-1794)	1575 (677-2345)	1646 (1329-3824)	1618 (1147-2351)
	Индекс влияния (ИБ, расч. ед) Influence index (etim. units)	2,5 (1,8-5,2)	3,3 (1,9-5,9)	3,0 (1,8-5,6)	3,0 (1,6-7,6)
	Количество пациен- тов с ИВ > 2,0 Number of patients showing effect index > 2,0	5/10	6/10	7/10	6/10

Примечание. Здесь и в таблице 5 данные представлены в виде медианы и интерквартильного диапазона (в скобках); р – значимость различий показателей по сравнению со значениями до вакцинации. U-критерий Манна–Уитни.

Note. Here and in table 5, the data are presented as median and interquartile range (in brackets). *, a significant difference compared with data before vaccination. P, Mann–Whitney U-test.

ТАБЛИЦА 5. МИТОГЕННАЯ РЕАКТИВНОСТЬ МНК БОЛЬНЫХ ХГС (ns = 10) В ДИНАМИКЕ ИММУНОТЕРАПИИ ДК

TABLE 5. MITOGENIC REACTIVITY OF MNC FROM THE PATIENTS WITH HCV INFECTION (ns = 10) IN THE COURSE OF DC IMMUNOTHERAPY

	КонА-индуцированная пролиферация (имп/мин) ConA-induced proliferation (cpm)	Индекс влияния (расч. ед) Influence index (estim. units)
До вакцино- терапии Before vaccination	10699 (2577-15200)	15 (10-60)
После инициирующего курса After initiating course	20585 (17167-24833)**	83 (68-117)**
После поддерживающего курса After maintenance course	22997 (19826-29587)**	104 (1-145)**
Через 6 месяцев наблюдения After 6 months of follow up	35015 (26286-37388)**	81 (66-154)**

Примечание. ** – $p < 0,001$; U-критерий Манна–Уитни.

Note. **, $p < 0.001$; Mann–Whitney U-test.

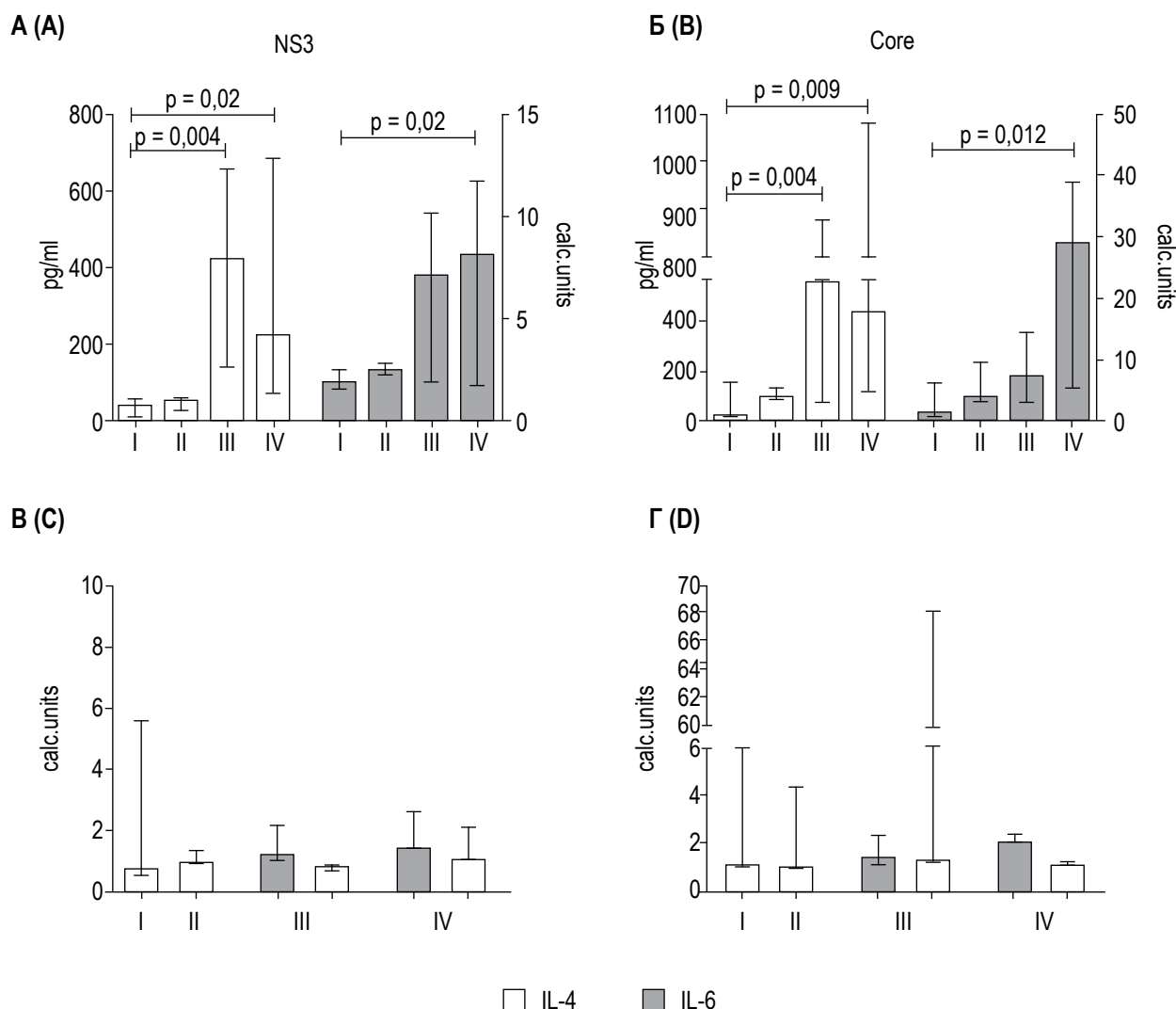


Рисунок 1. Продукция IFN γ , IL-4 и IL-6 в культурах МНК, стимулированных Core и NS3 антигенами, в динамике иммунотерапии ДК

Примечание. Представлены данные (Me; $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$) по продукции IFN γ (А, Б) и IL-4, IL-6 (В, Г) в культурах МНК пациентов с ХГС (ns = 10) до начала иммунотерапии (I), после иницирующего курса (II), после поддерживающего курса (III) и через 6 месяцев наблюдения (IV). По левой оси ординат – продукция IFN γ (пг/мл), по правой – индекс влияния вирусных антигенов (расч. ед.). p – достоверность различия по сравнению с исходными значениями (U-критерий Манна–Уитни).

Figure 1. Production of IFN γ , IL-4 and IL-6 by MNC stimulated by NS3 and Core antigens in the dynamics of DC immunotherapy. Note. IFN γ (A, B) and IL-4, IL-6 (C, D) production by MNCs of patients with HCV infection (ns = 10) before DC immunotherapy (I), after an initiating course (II), upon maintenance course (III) and after 6 months of follow up (IV) are presented as median and inter-quartile ranges. On the left-hand, y-axis – IFN γ production (pg/ml); right side, the influence index of viral antigens (estim. units). * p, significance of changes as compared to baseline values (Mann–Whitney U-test).

шего наблюдения. После проведения поддерживающего курса иммунотерапии стимуляция МНК Core и NS3 антигенами практически не усиливала продукцию IL-6. При обследовании пациентов спустя 6-месячный период наблюдения вирусные антигены обладали слабовыраженным стимулирующим эффектом на продукцию IL-6, однако и в этом случае стимулирующий эффект антигенов в отношении IL-6 был существенно ниже, чем в отношении IFN γ .

Анализ взаимосвязей между антиген-специфической пролиферацией и продукцией цитокинов показал, что через 6 месяцев после завершения вакцинотерапии пролиферация МНК на вирусные антигены находилась в прямой взаимосвязи с продукцией IFN γ . На это указывало наличие значимой корреляционной связи между продукцией IFN γ и уровнем пролиферации в NS3-стимулированных культурах МНК ($R_{ss} = 0,83$; $ps = 0,04$) и между продукцией IFN γ

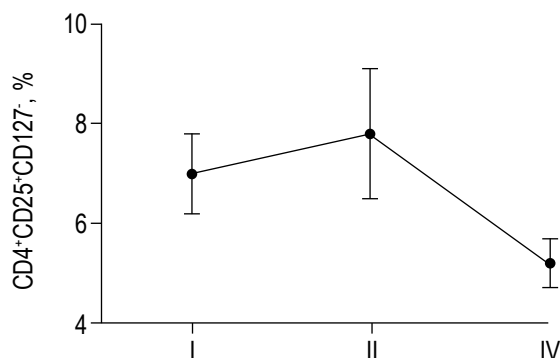


Рисунок 2. Относительное содержание CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg в динамике иммунотерапии ДК

Примечание. Данные представлены в виде M±S.E. I – до начала иммунотерапии, II – после иницирующего курса и IV – через 6 месяцев наблюдения.

Figure 2. The relative content of CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg in the dynamics of DC immunotherapy

Note. Data are presented as M±S.E. I, before DC immunotherapy; II, after initiating course, and IV, at 6 months of follow up.

и ИВ_{CORE} в Core-стимулированных культурах ($R_{ss} = 0,78$; $ps = 0,036$). Какой-либо взаимосвязи антиген-специфического пролиферативного ответа МНК с продукцией IL-4 или IL-6 не выявлялось. Таким образом, вакцинация ДК, нагруженными Core и NS3 антигенами, не вызвала значимой активации антиген-специфических Th2-клеток.

Чтобы исследовать возможное влияние иммунотерапии на генерацию регуляторных Т-клеток (Treg), было оценено относительное содержание CD4⁺CD25⁺CD127⁻ Treg в периферической крови больных в динамике лечения. Как видно из данных рисунка 2, относительное содержание Treg после проведения иницирующего курса вакцинации, а также к исходу 6-месячного наблюдения после завершения иммунотерапии значительно не увеличивалось. Следует также отметить, что исходно (перед началом иммунотерапии) и на момент завершения исследования между количеством Treg и антиген-специфическим ответом не выявлялось какой-либо взаимосвязи. Однако после иницирующего курса иммунотерапии содержание CD4⁺CD25⁺CD127⁻ клеток прямо коррелировало с NS3-специфическим пролиферативным ответом ($R_{ss} = 0,83$; $ps = 0,002$).

Анализ вирусной нагрузки с помощью количественного ПЦР на РНК вируса гепатита С показал, что индукция иммунного ответа к Core и в меньшей степени NS3 антигенам не сопровождалась значимым изменением вирусной нагрузки после иницирующего, поддерживающего курса и последующего 6-месячного наблюдения. При анализе

индивидуальных значений снижение вирусной нагрузки после иницирующего курса регистрировалось у 4 из 10 пациентов, однако к завершению 6-месячного наблюдения этот эффект сохранялся только у двух пациентов. В 6 из 10 случаев уровень вирусной нагрузки к исходу 6-месячного наблюдения не отличался от такового перед началом иммунотерапии, и у 2 пациентов наблюдалось возрастание вирусной нагрузки на один порядок.

Несмотря на отсутствие значимого вирусологического ответа на фоне вакцинации, важно отметить, что через 6 месяцев после завершения вакцинации между уровнем вирусной нагрузки и пролиферативным ответом на NS3 антигены выявлялась обратная корреляционная связь ($R_{ss} = -0,62$; $ps = 0,05$). Кроме того, показатели вирусной нагрузки на уровне тренда обратно коррелировали с NS3-специфической продукцией IFN γ ($R_{ss} = -0,71$; $ps = 0,1$). Обратная взаимосвязь вирусной нагрузки с уровнем Core-специфической продукции IFN γ регистрировалась на уровне тренда уже после иницирующего курса и сохранялась к моменту завершения 6-месячного наблюдения ($R_{ss} = -0,64$; $ps = 0,1$).

Обсуждение

Данные о том, что выздоровление пациентов с вирусным гепатитом С ассоциировано с сильным противовирусным Т-клеточным ответом, в индукции которого ведущая роль отводится ДК, позволяет предполагать, что терапевтические ДК-вакцины могут быть использованы для индукции или усиления специфического иммунного ответа у больных с ХГС. В соответствии с этим предположением было изучено влияние иммунотерапии ДК на параметры Т-клеточного иммунного ответа у больных ХГС.

Полученные результаты показали, что вакцинация ДК, которые генерировали из моноцитов в присутствии интерферона-альфа и нагружали рекомбинантными вирусными белками Core (ак 1–120) и NS3 (ак 1192–1457), характеризуется хорошей переносимостью и не вызывает тяжелых нежелательных явлений, выраженных местных или системных поствакцинальных реакций и усиления биохимических проявлений активности гепатита.

Исследования *ex vivo* иммунологических параметров в динамике лечения также продемонстрировали, что вакцинация приводила к индукции выраженного устойчивого иммунного ответа на Core и умеренного ответа на NS3. Специфический ответ на Core проявлялся усилением пролиферации МНК и продукции IFN γ при антиген-специфической стимуляции МНК. Возрастание

реактивности к Core антигену регистрировалось после иницирующего курса и было наиболее выраженным после поддерживающего курса и последующего 6-месячного наблюдения. В то же время NS3-специфический ответ проявлялся преимущественно усилением продукции $IFN\gamma$ после поддерживающего курса и последующего 6-месячного наблюдения. Усиление пролиферативной активности МНК на NS3 было слабо выраженным и недостоверным. Важно отметить, что вакцинация уже после иницирующего курса сопровождалась восстановлением митогенной реактивности Т-клеток у больных ХГС. При этом мы не наблюдали активации антиген-специфической продукции IL-4 и IL-6, т.е. индукции Th2-ответа. Кроме того, иммунотерапия ДК не сопровождалась возрастанием относительного содержания регуляторных ($CD4^+CD25^+CD127^-$) Т-клеток.

Ранее Li W. и соавт. продемонстрировали способность ДК здоровых доноров, экспрессирующих Core и NS3 белки, вызывать пролиферацию антиген-специфических Т-клеток и продукцию $IFN\gamma$, а также других цитокинов в культуре *in vitro* [18]. Позднее было показано, что ДК, трансфецированные аденовирусом, содержащим NS3 (AdNS3), способны активировать *in vitro* специфические $IFN\gamma$ продуцирующие Т-клетки не только у здоровых доноров, но и больных ХГС. Причем в отличие от ДК доноров, активирующих специфический иммунный ответ при трансфекции только одного NS3, ДК больных индуцировали NS3-специфический ответ только при совместной трансфекции AdNS3 и адапторной молекулы CFh40L, кодирующей CD40L [8].

Несмотря на стимулирующий эффект ДК *in vitro*, пилотные клинические исследования ДК у больных ХГС не выявили эффективной индукции Т-клеточного ответа. Так, трехкратная вакцинация ДК, трансфецированными AdNS3 и CFh40L, вызвала кратковременную активацию $IFN\gamma$ -продуцирующих Т-клеток в культурах NS3-стимулированных МНК только у 1 из 5 пациентов [33]. В другом исследовании Gowans E.J. и соавт. исследовали иммуностимулирующий эффект ДК, которые нагружали вирусными антигенами, Core, NS3 и NS4, соединенными с липидным остатком, являющимся лигандом для Toll-подобных рецепторов 2 типа. Появление Core-специфических цитотоксических Т-лимфоцитов отмечалось только у 3 из 6 пациентов, а NS3-специфических CD8 Т-клеток у 1 из 6 пациентов, причем иммунный ответ был нестойким [10].

В качестве одной из причин несостоятельности антиген-специфического ответа у больных ХГС обсуждается повышенное содержание Treg и иммуносупрессивных цитокинов [22]. Так, низкую иммуностимулирующую активность ДК, трансфецированных AdNS3 и CFh40L, у больных ХГС авторы объяснили усилением продукции IL-10 дендритными клетками больных и генерацией Treg после трансдукции CFh40L [33]. В нашем исследовании иммунотерапия ДК не сопровождалась экспансией $CD4^+CD25^+CD127^-$ регуляторных Т-клеток, что, по-видимому, способствовало индукции антиген-специфического ответа.

Следует отметить, что в обоих клинических исследованиях [10, 33] авторы не выявили снижения вирусной нагрузки, что объяснялось недостаточной силой и устойчивостью иммунного ответа. В нашем исследовании в целом по группе значимого снижения виремии также не отмечалось. Тем не менее при индивидуальном анализе у 4 пациентов наблюдалось преходящее, а у 2 – стойкое снижение виремии. В 6 из 10 случаев виремия на протяжении 13 месяцев исследования не нарастала, сохраняясь на исходно умеренном уровне. Более того, на момент завершения исследования между уровнем виремии и антиген-специфическим ответом регистрировалась обратная корреляционная связь (статистически значимая в отношении NS3-стимулированной пролиферации МНК, на уровне выраженного тренда – в отношении NS3 и Core-стимулированной продукции $IFN\gamma$).

Согласно данным литературы, неструктурный вирусный белок NS3 обладает протеазной и геликазной активностью и играет важную роль в размножении вируса [6]. Сильный и устойчивый Т-клеточный иммунный ответ к эпитопам этого белка сопряжен с более эффективным контролем за вирусом [3, 5]. Кроме того, высокая цитотоксическая активность NS3-специфических Т-клеток ассоциирована с ответом на терапию интерфероном- α [32]. Полученные нами данные об обратной взаимосвязи виремии с уровнем NS3 специфического ответа у больных ХГС являются еще одним аргументом в пользу важной роли NS3-специфических Т-клеток в контроле над репликацией вируса. Однако выявление наряду с этим обратной взаимосвязи между виремией и Core-индуцированной продукцией $IFN\gamma$ позволяет предполагать, что Core-специфические Т-клетки также могут участвовать в элиминации вируса.

Действительно, известно, что противовирусный эффект Т-клеток опосредуется как за счет прямого цитолитического действия, так и про-

дукции IFN γ [13]. В наших исследованиях вакцинация сопровождалась значимым усилением продукции IFN γ при стимуляции как NS3, так и Core, причем усиление пролиферации МНК при стимуляции обоими антигенами коррелировало с продукцией IFN γ . Это позволяет полагать, что, будучи источником, IFN γ Core-специфические клетки, наряду с NS3-специфическими Т-лим-

фоцитами, также могут участвовать в ограничении репликации вируса.

В целом полученные данные свидетельствуют о безопасности иммунотерапии IFN-ДК, нагруженными рекомбинантными вирусными антигенами, и позволяет рассматривать данный подход в качестве дополнения к терапии пегилированными интерферонами и рибавирином для улучшения результатов лечения.

Список литературы / References

1. Олейник Е.А., Леплина О.Ю., Тыринова Т.В., Тихонова М.А., Пыринова Г.Б., Останин А.А., Старостина Н.М., Черных Е.Р. Влияние рекомбинантных белков Core и NS3 вируса гепатита С на созревание и функции дендритных клеток, генерируемых *in vitro* в присутствии интерферона-альфа // Иммунология, 2016. Т. 37, № 5. С. 239-245. [Oleynik E.A., Leplina O.Yu., Tyrinova T.V., Tikhonova M.A., Pyrinova G.B., Ostanin A.A., Starostina N.M., Chernykh E.R. The influence of recombinant HCV proteins Core and NS3 on maturation and functions of dendritic cells generated *in vitro* with interferon-alpha. *Immunologiya = Immunology*, 2016, Vol. 37, no. 5, pp. 239-245. (In Russ.)]
2. Auffermann-Gretzinger S., Keffe E.B., Levy S. Impaired dendritic cell maturation in patients with chronic, but not resolved, hepatitis C virus infection. *Blood*, 2001, Vol. 97, no. 10, pp. 3171-3176.
3. Bronowicki J.P., Vetter D., Uhl G., Hudziak H., Uhrmacher A., Vetter J.M., Doffoel M. Lymphocyte reactivity to hepatitis C virus (HCV) antigens shows evidence for exposure to HCV in HCV-seronegative spouses of HCV-infected patients. *J. Infect Dis.*, 1997, Vol. 176, no. 2, pp. 518-522.
4. Caetano J., Martinho A., Paiva A., Pais B., Valente C., Luxo C. Differences in hepatitis C virus (HCV)-specific CD8 T-cell phenotype during pegylated alpha interferon and ribavirin treatment are related to response to antiviral therapy in patients chronically infected with HCV. *J. Virol.*, 2008, Vol. 82, no. 15, pp. 7567-7577.
5. Diepolder H.M., Gerlach J.T., Zachoval R., Hoffmann R.M., Jung M.C., Wierenga E.A., Scholz S., Santantonio T., Houghton M., Southwood S., Sette A., Pape G.R. Immunodominant CD4 T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J. Virol.*, 1997, Vol. 71, no. 8, pp. 6011-6019.
6. Dubuisson J. Hepatitis C virus proteins. *World J. Gastroenterol.*, 2007, Vol. 13, no. 17, pp. 2406-2415.
7. Eickhoff S., Brewitz A., Gerner M.Y., Klauschen F., Komander K., Hemmi H., Garbi N., Kaisho T., Germain R.N., Kastentmüller W. Robust anti-viral immunity requires multiple distinct T cell-dendritic cell interactions. *Cell*, 2015, Vol. 162, no. 6, pp. 1322-1337.
8. Echeverria I., Pereboev A., Silva L., Zabaleta A., Riezu-Boj J.I., Bes M., Cubero M., Borrás-Cuesta F., Lasarte J.J., Esteban J.I., Prieto J., Sarobe P. Enhanced T cell responses against hepatitis C virus by *ex vivo* targeting of adenoviral particles to dendritic cells. *Hepatology*, 2011, Vol. 54, no. 1, pp. 28-37.
9. Farkas A., Kemény L. Interferon- α in the generation of monocyte-derived dendritic cells: recent advances and implications for dermatology. *Br. J. Dermatol.*, 2011, Vol. 165, no. 2, pp. 247-254.
10. Gowans E.J., Roberts S., Jones K., Dinatale I., Latour P.A., Chua B., Eriksson E.M., Chin R., Li S., Wall D.M., Sparrow R.L., Moloney J., Loudovaris M., Ffrench R., Prince H.M., Hart D., Zeng W., Torresi J., Brown L.E., Jackson D.C. A phase I clinical trial of dendritic cell immunotherapy in HCV-infected individuals. *J. Hepatol.*, 2010, Vol. 53, no. 4, pp. 599-607.
11. Ghany M.G., Strader D.B., Thomas D.L., Seeff L.B. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C: an update. *Hepatology*, 2009, Vol. 49, no. 4, pp. 1335-1374.
12. Houghton M. Prospects for prophylactic and therapeutic vaccines against the hepatitis C viruses. *Immunol. Rev.*, 2011, Vol. 239, no. 1, pp. 99-108.
13. Jo J., Aichele U., Kersting N., Klein R., Aichele P., Bisse E., Sewell A.K., Blum H.E., Bartenschlager R., Lohmann V., Thimme R. Analysis of CD8⁺ T-cell-mediated inhibition of hepatitis C virus replication using a novel immunological model. *Gastroenterology*, 2009, Vol. 136, no. 4, pp. 1391-1401.
14. Klenerman P., Thimme R. T cell responses in hepatitis C: the good, the bad and the unconventional. *Gut*, 2012, Vol. 61, no. 8, pp. 1226-1234.

15. Kamal S.M., Fehr J., Roesler B., Peters T., Rasenack J.W. Peginterferon alone or with ribavirin enhances HCV-specific CD4 T-helper 1 responses in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology*, 2002, Vol. 123, no. 4, pp. 1070-1083.
16. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihofer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN-alpha acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J. Transl. Med.*, 2007, Vol. 5, no. 1, pp. 46-57.
17. Krishnadas D.K., Ahn J.S., Han J., Kumar R., Agrawal B. Immunomodulation by hepatitis C virus-derived proteins: targeting human dendritic cells by multiple mechanisms. *Int. Immunol.*, 2010, Vol. 22, no. 6, pp. 491-502.
18. Li W., Krishnadas D.K., Li J., Tyrrell D.L., Agrawal B. Induction of primary human T cell responses against hepatitis C virus-derived antigens NS3 or core by autologous dendritic cells expressing hepatitis C virus antigens: potential for vaccine and immunotherapy. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 176, no. 10, pp. 6065-6075.
19. Lapenta C., Santini S.M., Spada M., Donati S., Urbani F., Accapezzato D., Franceschini D., Andreotti M., Barnaba V., Belardelli F. IFN-alpha-conditioned dendritic cells are highly efficient in inducing cross-priming CD8(+) T cells against exogenous viral antigens. *Eur. J. Immunol.*, 2006, Vol. 36, no. 8, pp. 2046-2060.
20. MohdHanafiah K., Groeger J., Flaxman A.D., Wiersma S.T. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: New estimates of age specific antibody to HCV seroprevalence. *Hepatology*, 2013, Vol. 57, no. 4, pp. 1333-1334.
21. Manns M.P., Wedemeyer H., Cornberg M. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut*, 2006, Vol. 55, no. 9, pp. 1350-1359.
22. Miroux C., Vausselein T., Delhem N. Regulatory T cells in HBV and HCV liver diseases: implication of regulatory T lymphocytes in the control of immune response. *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2010, Vol. 10, no. 11, pp. 1563-1572.
23. Petruzzello A., Marigliano S., Loquercio G., Cozzolino A., Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: An up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J. Gastroenterol.*, 2016, Vol. 22, no. 34, pp. 7824-7840.
24. Roohvand F., Kossari N. Advances in hepatitis C virus vaccines, part two: advances in hepatitis C virus vaccine formulations and modalities. *Expert Opin. Ther. Pat.*, 2012, Vol. 22, no. 4, pp. 391-415.
25. Randolph G.J., Beaulieu S., Lebecque S., Steinman R.M., Muller W.A. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*, 1998, Vol. 282, no. 5388, pp. 480-483.
26. Rosen H.R. Emerging concepts in immunity to hepatitis C virus infection. *J. Clin. Invest.*, 2013, Vol. 123, no. 10, pp. 4121-4130.
27. Santini S.M., Lapenta C., Logozzi M., Parlato S., Spada M., Di Pucchio T., Belardelli F. Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity *in vitro* and in hu-pbl-scid mice. *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 191, no. 10, pp. 1777-1788.
28. Sachdeva M., Chawla Y.R., Arora S.R. Dendritic cells: The warriors upfront-turned defunct in chronic hepatitis C infection. *World J. Hepatol.*, 2015, Vol. 7, no. 19, pp. 2202-2208.
29. Thompson A.J., Holmes J.A. Treating hepatitis C – what's new? *Aust. Prescr.*, 2015, Vol. 38, no. 6, pp. 191-197.
30. Thimme R., Bukh J., Spangenberg H.C., Wieland S., Pemberton J., Steiger C., Govindarajan S., Purcell R.H., Chisari F.V. Viral and immunological determinants of hepatitis C virus clearance, persistence, and disease. *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 2002, Vol. 99, no. 24, pp. 15661-15668.
31. Thurner B., Roder C., Dieckmann D., Heuer M., Kruse M., Glaser A., Keikavoussi P., Kampgen E., Bender A., Schuler G. Generation of large numbers of fully mature and stable dendritic cells from leukapheresis products for clinical applications. *J. Immunol. Meth.*, 1999, Vol. 224, no. 1-2, p. 211.
32. Vertuani S., Bazzaro M., Gualandi G., Micheletti F., Marastoni M., Fortini C., Canella A., Marino M., Tomatis R., Traniello S., Gavioli R. Effect of interferon-alpha therapy on epitope-specific cytotoxic T lymphocyte responses in hepatitis C virus-infected individuals. *Eur. J. Immunol.*, 2002, Vol. 32, no. 1, pp. 144-154.
33. Zabaleta A., D'Avola D., Echeverria I., Llopiz D., Silva L., Villanueva L., Riezu-Boj J.I., Larrea E., Pereboev A., Lasarte J.J., Rodriguez-Lago I., Icarrairaequi M., Sangro B., Prieto J., Sarobe P. Clinical testing of a dendritic cell targeted therapeutic vaccine in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.*, 2015, Vol. 11, no. 2, p. 15006.

34. Zhu W., Chang Y., Wu C., Han Q., Pei R., Lu M., Chen X. The wild-type hepatitis C virus core inhibits initiation of antigen-specific T- and B-cell immune responses in BALB/c mice. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2010, Vol. 17, no. 7, pp. 1139-1147.

35. Zhou Y., Zhang Y., Yao Z., Moorman J.P., Jia Z. Dendritic cell-based immunity and vaccination against hepatitis C virus infection. *Immunology.*, 2012, Vol. 136, no. 4, pp. 385-396.

Авторы:

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

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

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

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

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

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

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

Authors:

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

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

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

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

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

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

Поступила 25.01.2017
Принята к печати 09.02.2017

Received 25.01.2017
Accepted 09.02.2017

ГЕТЕРОГЕННОСТЬ ПОПУЛЯЦИЙ НК- И НКТ-ЛИМФОЦИТОВ У ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

Табакон Д.В., Заботина Т.Н., Борунова А.А., Панчук И.О.,
Короткова О.В., Кадагидзе З.Г.

Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный
центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Натуральные киллеры (НК) и НКТ-лимфоциты являются важными составляющими врожденного иммунитета и играют роль первой линии защиты от онкологических заболеваний. Данные популяции отличаются высокой гетерогенностью и разделяются на несколько субпопуляций, отличающихся по степени экспрессии маркеров CD56 и CD16 и функциональной активностью. Исследование гетерогенности данных популяций лимфоцитов у здоровых доноров актуально, так как является основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями у онкологических больных. Изменения соотношения выше представленных субпопуляций могут обладать прогностическим и клиническим значением при опухолевых заболеваниях. Было проведено исследование лимфоцитов периферической крови 50 здоровых доноров. При анализе популяции НК-лимфоцитов было выявлено $18,0 \pm 11,3\%$ антиген-положительных клеток, колебания значений составило от 7,6 до 29,2%, в то время как количество клеток с фенотипами CD3⁺CD56⁺ и CD3⁺CD16⁺ было равно $16,2 \pm 8,1$ и $11,0 \pm 6,7\%$ соответственно. Анализ субпопуляционной структуры показал, что основной пул НК-клеток представлен CD56^{dim}CD16^{dim} клетками $52,3 \pm 19,9\%$, а минорные субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ составляют $0,3 \pm 0,2$, $1,7 \pm 0,9$ и $1,3 \pm 0,6\%$ соответственно. При исследовании внутриклеточного содержания перфорина оказалось, что количество CD56⁺Perf⁺ клеток в среднем равно $25,1 \pm 14,8\%$, а CD16⁺Perf⁺ – $23,8 \pm 16,0\%$. Цитометрический анализ показал, что перфорин преимущественно содержится в CD56^{dim}CD16^{dim} НК-лимфоцитах, в то время как CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ перфорина не содержали. В работе впервые обнаружена субпопуляция НК-клеток с иммунофенотипом CD56^{dim}CD16^{dim}, не содержащая внутриклеточный перфорин (2,0%). Популяция НКТ-клеток с фенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺ является в 7,1% (25% – 3,45; 75% – 8,75) антиген-положительных клеток в диапазоне от 2,5 до 11,9% и не подчиняется законам нормального распределения. При анализе с помощью комбинации МКА CD3/CD56/CD16 количество CD3⁺CD56⁺ клеток составило 4,33% (25% – 2,25; 75% – 7,3), а количество CD3⁺CD16⁺ – 3,087% (25% – 0,9; 75% – 6,2). Оказалось, что различия между определением с помощью тест-системы CD3/CD16/CD56 и с помощью CD3/CD16 является статистически значи-

Адрес для переписки:

Табакон Дмитрий Вячеславович
Научно-исследовательский институт клинической
онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный
центр им. Н.Н. Блохина» Министерства
здравоохранения РФ
115478, Россия, Москва, Каширское шоссе, 23.
Тел.: 8 (962) 956-25-97.
E-mail: stargazer91@mail.ru

Address for correspondence:

Tabakov Dmitry V.
Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research
Center for Oncology
115478, Russian Federation, Moscow, Kashirskoye ch., 23.
Phone: 7 (962) 956-25-97.
E-mail: stargazer91@mail.ru

Образец цитирования:

Д.В. Табаков, Т.Н. Заботина, А.А. Борунова, И.О. Панчук,
О.В. Короткова, З.Г. Кадагидзе «Гетерогенность
популяций НК- и НКТ-лимфоцитов у здоровых доноров»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 401–408.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408

© Табаков Д.В. и соавт., 2017

For citation:

D.V. Tabakov, T.N. Zabolina, A.A. Borunova, I.O. Panchuk,
O.V. Korotkova, Z.G. Kadagidze "Heterogeneity of NK and NKT
lymphocyte populations in healthy donors", Medical Immunology
(Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4,
pp. 401–408. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-401-408

мой ($p < 0,05$). Было показано, что основной пул NKT-клеток составляют $CD56^+CD16^-$ клетки, количество которых 5,45% (25% – 2,95; 75% – 7,3) среди $CD3^+$ лимфоцитов. При этом были выявлены две минорные субпопуляции, отличающиеся по экспрессии антигенов CD56 и CD16. Так уровень $CD56^+CD16^+$ составил 3% (25% – 0,25; 75% – 3,05), а количество $CD56^+CD16^+$ оказалось равным 0,67% (25% – 0,25; 75% – 0,9). Таким образом, широкое фенотипическое разнообразие NK- и NKT-клеток отражает их способность к реализации различной функциональной активности. Данное исследование, указывающее на высокую гетерогенность NK- и NKT-лимфоцитов, может послужить основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями этих клеток у онкологических больных.

Ключевые слова: проточная цитометрия, иммунофенотип, NK-лимфоциты, NKT-лимфоциты, перфорин, субпопуляции лимфоцитов, CD56, CD16

HETEROGENEITY OF NK AND NKT LYMPHOCYTE POPULATIONS IN HEALTHY DONORS

Tabakov D.V., Zabolina T.N., Borunova A.A., Panchuk I.O.,
Korotkova O.V., Kadagidze Z.G.

Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Abstract. Natural killer (NK) and NKT lymphocytes are important components of innate immunity, and compose a first-line defense against cancer. These populations are characterized by high heterogeneity and are divided into several subpopulations, by differences in functional activity as well as CD56 and CD16 expression. Studying heterogeneity for these lymphocyte populations in healthy donors is important, due to imbalance between different lymphocyte subsets in cancer patients. Changes in the ratio of these subpopulations may be of prognostic and clinical significance in malignant diseases. The present study was conducted with peripheral blood lymphocytes in 50 healthy donors. When analysing population of NK lymphocytes we have identified $18.0 \pm 11.3\%$ of antigen-positive cells, their fluctuations ranged from 7.6 to 29.2%, whereas average number of cells with $CD3^+CD56^+$ and $CD3^+CD16^+$ phenotypes was equal to $16.2 \pm 8.1\%$, and $11.0 \pm 6.7\%$, respectively. The subpopulation analysis showed that the primary pool of NK cells was presented by $CD56^{\dim}CD16^{\dim}$ cells by 52.3 ± 19.9 percent. We detected minor subpopulations, e.g., $CD56^{\dim}CD16^{\text{bright}}$, $CD56^{\dim}CD16^+$, $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ ($0.3 \pm 0.2\%$, $1.7 \pm 0.9\%$, and $1.3 \pm 0.6\%$, respectively). Search for intracellular perforin has revealed that the number of $CD56^+Perf^+$ cells comprised $25.1 \pm 14.8\%$, $CD16^+Perf^+$, $23.8 \pm 16.0\%$. Cytometric analysis showed that perforin is found, predominantly, in $CD56^{\dim}CD16^{\dim}$ NK lymphocytes, whereas the cells with $CD56^{\dim}CD16^{\text{bright}}$, $CD56^{\dim}CD16^+$, $CD56^{\text{bright}}CD16^-$ immunophenotypes did not produce perforin. For the first time, we have discovered a subpopulation of NK cells with the $CD56^{\dim}CD16^{\dim}$ immunophenotype that did not contain intracellular perforin (2.0%). The NKT cell population with $CD3^+CD16/CD56^+$ phenotype was detected in 7.1% (25% – 3.45; 75% – 8.75) antigen-positive cells, within a range of 2.5 to 11.9%. Analysis with a combination of monoclonal antibodies CD3/CD56/CD16 has shown that the number of $CD3^+CD56^+$ cells was 4.33% (25% – 2.25; 75% – 7.3), whereas the number of $CD3^+CD16^+$ was 3.087% (25% – 0.9; 75% – 6.2). These data demonstrate that the differences in results between the CD3/CD16/CD56, and CD3/CD16 test systems are statistically significant ($p < 0.05$). It was shown that the primary-pool NKT-cells are $CD56^+CD16^-$ cells, whose number is about 5.45% (25% – 2.95; 75% – 7.3) among total $CD3^+$ lymphocyte population. Two minor subpopulations were also detected which differed in expression of CD56 and CD16 antigens. Hence, the level of $CD56^+CD16^+$ cells was 3% (25% – 0.25; 75% – 3.05), and the number of $CD56^+CD16^+$ was equal to 0.67% (25% – 0.25; 75% – 0.9). Hence, the observed wide phenotypic diversity of NK and NKT-cells reflects their ability to exert various functional activities. This study, showing high heterogeneity of NK and NKT lymphocytes, may serve as a basis for the study of imbalances between different subpopulations of these cells in cancer patients.

Keywords: flow cytometry, immunophenotype, NK cells, NKT cells, perforin, lymphocyte subsets, CD56, CD16

Введение

Основными иммунокомпетентными клетками организма человека являются лимфоциты, которые делятся на несколько линейных популяций, несущих определенные функции (Т-, В-, NK-лимфоциты). В ходе развития методов исследования оказалось, что данные популяции гетерогенны и, в свою очередь, разделяются на несколько субпопуляций, способных выполнять как эффекторные, так и регуляторные функции. Нарушение баланса между этими субпопуляциями происходит при многих заболеваниях, в том числе онкологических [7]. При изучении иммунофенотипа линейных популяций лимфоцитов периферической крови первичных больных раком яичников до и после хирургического лечения было обнаружено, что происходит нарушение линейности, то есть у таких больных снижено количество Т-лимфоцитов по сравнению с контрольной группой доноров ($62,5 \pm 3,1$ и $73,9 \pm 2,5\%$ соответственно), в том числе за счет повышения количества NK-лимфоцитов [4]. При подобном исследовании у первичных больных раком молочной железы оказалось, что происходит повышение ряда регуляторных популяций, таких как Т-регуляторные клетки с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^-FoxP3^+$, $CD8^+CD28^-CD11b^-$ и NKT-лимфоциты, причем в подавляющем большинстве случаев повышается именно количество NKT-клеток [3].

NK-клетки являются важной частью врожденного иммунитета. Отличительной характеристикой NK-лимфоцитов является их способность к активации без предварительной стимуляции антигеном [15, 18]. Классический фенотип NK-клеток $CD3^-CD56^+$ и/или $CD16^+$. CD56 или NCAM (Neural cell adhesion molecule) — связывающий гликопротеин, экспрессированный на нейронах, клетках глии, скелетной мускулатуры и натуральных киллерах, играющий роль в межклеточной адгезии, росте нервов и образовании синапсов [19]. CD16 представляет собой мембранный низкоаффинный IgG рецептор III типа. Эта молекула участвует в антителозависимой клеточной цитотоксичности, осуществляемой NK-клетками [23]. По степени экспрессии белков CD56 и CD16 выделяют три субпопуляции NK-лимфоцитов. Основной субпопуляцией являются $CD56^{dim}CD16^{dim}$ клетки со средней экспрессией данных маркеров. Они обладают высокой способностью к цитотоксичности и меньшей к продукции цитокинов и являются эффекторными. Минорная субпопуляция $CD56^{bright}CD16^-$ клеток практически не способна к секреции перфорина, но обладает высокой способностью к пролиферации и секреции цитокинов. Цитокины, секретируемые NK-клетками, относятся

в основном к провоспалительному ряду (TNF α , IFN γ). В то же время некоторые NK-клетки способны синтезировать IL-10, подавляющий иммунный ответ [5, 11, 14]. $CD56^-CD16^{bright}$ клетки также секретируют цитокины, но слабо способны продуцировать перфорин и пролиферировать [8, 9, 12, 26, 29]. Данные две субпопуляции обладают регуляторными функциями. Таким образом, различный фенотип субпопуляций NK-клеток отражает их различия по функциональной активности, и изменение их соотношения может обладать прогностическим и клиническим значением при различных заболеваниях.

NKT-клетки также являются важным элементом врожденного иммунитета человека. Их содержание в периферической крови 1-10%. Имеют черты как Т-, так и NK-лимфоцитов, классический фенотип представляет собой $CD3^+CD56^+$ и/или $CD16^+$. NKT-лимфоциты также обладают гетерогенностью и делятся на два типа — инвариантные (iNKT), обладающие ограниченной вариабельностью цепей Т-клеточного рецептора, и NKT-лимфоциты II типа, представляющие большинство NKT-клеток у человека. iNKT распознают гликолипидные антигены, ассоциированные с молекулой CD1d, представляющей собой аналог молекулы МНС, и обладают в основном цитотоксической функцией. NKT II типа распознают сульфатид-антиген, способны продуцировать цитокины и играют регуляторную роль при опухолевых и аутоиммунных заболеваниях. В ряде источников описано понижение количества iNKT-лимфоцитов при онкологических заболеваниях, наряду с встречающимся повышением числа NKT-клеток II типа. Также показано подавление активности iNKT-клеток NKT-лимфоцитами II типа, что связывают с прогрессированием опухолевого роста [10, 24, 28].

Таким образом, исследование гетерогенности данных популяций лимфоцитов у здоровых доноров актуально, так как является основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями у онкологических больных. Изменения соотношения вышепредставленных субпопуляций могут обладать прогностическим и клиническим значением при опухолевых заболеваниях.

Материалы и методы

В качестве клеток-мишеней использовали лимфоциты периферической крови 50 здоровых доноров, из которых 38 женщин (76%) и 12 мужчин (24%). Средний возраст составил 29 лет (от 22 до 42 лет).

Выделение лимфоцитов из периферической крови осуществляли с помощью разделения клеток на градиенте плотности фиколла-урографина

ТАБЛИЦА 1. СПЕЦИФИЧНОСТЬ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ, ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В РАБОТЕ

TABLE 1. THE SPECIFICITY OF THE MONOCLONAL ANTIBODIES USED IN THE PRESENT WORK

Кластер дифференцировки (CD), антиген, белок Cluster of differentiation (CD), an antigen, a protein	Клетки-мишени Target Cells
CD3	Зрелые Т-лимфоциты Mature T-lymphocytes
CD8	Субпопуляция Т-лимфоцитов, субпопуляция НК-клеток Subpopulation of T-lymphocytes, subpopulation of NK cells
CD4	Субпопуляция Т-лимфоцитов Subpopulation of T-lymphocytes
CD16	Субпопуляция НК-клеток Subpopulation of NK cells
CD56	Субпопуляция НК-клеток Subpopulation of NK cells
перфорин perforin	Субпопуляция Т-лимфоцитов, субпопуляция НК-клеток Subpopulation of T-lymphocytes, subpopulation of NK cells
CD45	Все лейкоциты Total leukocyte marker

(1,077 г/см), полученную суспензию мононуклеарных клеток дважды отмывали средой PBS с последующим центрифугированием на 1500 об/мин центрифуги СМ-6 (Elmi).

Окрашивание клеток осуществляли в прямой реакции иммунофлуоресценции с применением моноклональных антител (МКА), конъюгированных различными флуорохромами: FITC, PE, PE-Cy5 (Beckman Coulter, BD Biosciences). Использовали следующие комбинации МКА к дифференцировочным антигенам лейкоцитов человека: CD45/CD14, CD3/CD56/CD16, CD3/CD16⁺CD56 (табл. 1).

Для изучения цитотоксической состоятельности НК- и NKT-лимфоцитов использовали коммерческую тест-систему, содержащую моноклональные антитела к внутриклеточному белку перфорины (BD Biosciences). В этом случае применяли комбинированное окрашивание поверхностных антигенов в сочетании с окрашиванием внутриклеточного белка CD8/Perforin/CD16, Perforin/CD56/CD16.

Многopараметровый количественный проточно-цитометрический анализ проводили на двухлазерном проточном цитометре аналитического типа FACSCalibur с применением пакета программного обеспечения сбора и анализа данных CELLQuest (BD Biosciences). Выделение гейта клеток осуществляли в смешанном линейно-логарифмическом режиме SSC vs CD45 (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки). В каждом образце накапливали и анализировали не менее 10000 событий в гейте CD45⁺ лимфоцитов. Субпопуляционную структуру клеток исследовали путем

дополнительного анализа ListMod файлов в программе WinMDI (версия 2.8) с применением стратегии последовательного гейтирования клеток. Использовали гистограммный и дот-плот анализ образцов, учитывали относительное число антиген(белок)-позитивных клеток (%), а также показатели среднего канала интенсивности флуоресценции для позитивной популяции клеток (MFI), отражающего количество антигенных детерминант на/в клетке.

Специфичность МКА представлена в таблице 1.

Полученные данные были обработаны с помощью программы Statistica 7.0, проведен тест на нормальность по Шапиро—Уилку и сравнение различных методов определения НК- и NKT-клеток с помощью U-теста и р-теста.

Результаты

Анализ NKT-лимфоцитов

Анализ CD45⁺ лимфоидных клеток показал, что популяция NKT-клеток с фенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺ выявляется в 7,1% (25% — 3,45; 75% — 8,75) антиген-положительных клеток в диапазоне от 2,5 до 11,9% и не подчиняется законам нормального распределения. При анализе с помощью комбинации МКА CD3/CD56/CD16 количество CD3⁺CD56⁺ клеток составило 4,33% (25% — 2,25; 75% — 7,3), а количество CD3⁺CD16⁺ — 3,087% (25% — 0,9; 75% — 6,2).

Оказалось, что различие между определением с помощью тест-системы CD3/CD16/CD56 и с помощью CD3/CD16 является статистически значимым (p < 0,05). Было показано, что основ-

ТАБЛИЦА 2. АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ NKT-ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 2. ANALYSIS OF NKT LYMPHOCYTE HETEROGENEITY

Иммунофенотип Immunophenotype	Количество Count (%)
CD3 ⁺ CD16 ⁺ /CD56 ⁺	7,1% (25% – 3,45; 75% – 8,75)
CD3 ⁺ CD56 ⁺	4,33% (25% – 2,25; 75% – 7,3)
CD3 ⁺ CD16 ⁺	3,087% (25% – 0,9; 75% – 6,2)
CD56 ⁺ CD16 ⁺	5,45% (25% – 2,95; 75% – 7,3)
CD56 ⁺ CD16 ⁺	3% (25% – 0,25; 75% – 3,05)
CD56 ⁺ CD16 ⁺	0,67% (25% – 0,25; 75% – 0,9)

ной пул NKT-клеток составляют CD56⁺CD16⁺ клетки, количество которых 5,45% (25% – 2,95; 75% – 7,3) среди CD3⁺ лимфоцитов. При этом были выявлены две минорные субпопуляции, отличающиеся по экспрессии антигенов CD56 и CD16. Так, уровень CD56⁺CD16⁺ составил 3% (25% – 0,25; 75% – 3,05), а количество CD56⁺CD16⁺ оказалось равным 0,67% (25% – 0,25; 75% – 0,9) (рис. 1, см. 3-ю стр. обложки; табл. 2).

Анализ NK-лимфоцитов

При анализе популяции NK-лимфоцитов с помощью тест-системы CD3/CD16/CD56 было выявлено 18,0±11,3% антиген-положительных клеток, колебание значений составило от 7,6 до 29,2%, в то время как количество клеток с фенотипами CD3⁺CD56⁺ и CD3⁺CD16⁺ было равно 16,2±8,1 и 11,0±6,7% соответственно. Следует отметить, что данные параметры имели нормальное распределение по тесту Шапиро–Уилка. Анализ субпопуляционной структуры показал, что основной пул NK-клеток представлен CD56^{dim}CD16^{dim} клетками 52,3±19,9%. А минорные субпопуляции CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ составляют 0,3±0,2, 1,7±0,9 и 1,3±0,6% соответственно (рис. 2, см. 3-ю стр. обложки; табл. 3).

Анализ функциональной активности NK-лимфоцитов

При исследовании внутриклеточного содержания перфорина оказалось, что количество

CD56⁺Perf⁺ клеток в среднем равно 25,1±14,8%, а CD16⁺Perf⁺ – 23,8±16,0%. Цитометрический анализ показал, что перфорин преимущественно содержится в CD56^{dim}CD16^{dim} NK-лимфоцитах, в то время как CD56^{dim}CD16^{bright}, CD56⁺CD16⁺, CD56^{bright}CD16⁺ перфорина не содержали (рис. 3, см. 3-ю стр. обложки).

Обсуждение

В результате проведенных исследований было выявлено, что количество NK-клеток составило в среднем 18% от всех лимфоцитов – от 7,6 до 29,2%, что согласуется с данными зарубежных авторов, где указывается, что число NK-лимфоцитов в периферической крови здоровых доноров составляет 2-20% [5, 13, 17]. При изучении субпопуляционной структуры натуральных киллеров подавляющее большинство NK-клеток имело иммунофенотип CD56^{dim}CD16^{dim} клеток, на долю которых приходилось 52,3±19,9% среди CD45⁺CD3⁺ клеток. Кроме того, были зафиксированы две субпопуляции с фенотипами CD56⁺CD16⁺ и CD56^{bright}CD16^{neg/low}, которые составили 1,7±0,9 и 1,3±0,6% среди CD45⁺CD3⁺ клеток соответственно. В зарубежных источниках в основном выделяют две субпопуляции – основную CD56^{dim}CD16^{dim} клеток (в некоторых источниках CD56^{dim}CD16^{bright}), при этом их доля составляет до 90% NK-лимфоцитов,

ТАБЛИЦА 3. АНАЛИЗ ГЕТЕРОГЕННОСТИ NK-ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 3. ANALYSIS OF HETEROGENEITY OF NK LYMPHOCYTES

Иммунофенотип Immunophenotype	Количество (%) Count (%)
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺ /CD56 ⁺	18,0±11,3%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺	16,2±8,1%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD16 ⁺	11,0±6,7%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ^{dim} CD16 ^{dim}	52,3±19,9%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ^{dim} CD16 ^{bright}	0,3±0,2%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD16 ⁺	1,7±0,9%
CD45 ⁺ CD3 ⁺ CD56 ^{bright} CD16 ⁺	1,3±0,6%

и минорную CD56^{bright}CD16^{neg/low}, на долю которых приходится до 10% [13, 20, 25, 27].

Количество NKT-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD16/CD56⁺ в нашем исследовании оказалось равно 7,1% (25% – 3,45; 75% – 8,75). По данным зарубежных источников, NKT-клетки представлены 5-10% лимфоцитов периферической крови здоровых доноров [10, 16]. Нами получены достоверно значимые результаты анализа числа NKT-клеток при использовании различных методических подходов. Так, при учете относительного числа CD3⁺CD56⁺NKT-клеток показатели оказались значительно ниже, чем при использовании тест-системы CD3/CD16/CD56.

Как видно из рисунка 1, при определении лишь одного из двух характерных для NKT-клеток маркеров (CD56 или CD16), значительная доля NKT-лимфоцитов, экспрессирующих только другой антиген, является недоступной для анализа. Доля NKT-лимфоцитов, экспрессирующих оба маркера, составила лишь 0,67% (25% – 0,25 75% – 0,9) среди CD45⁺CD3⁺ клеток.

Соотношение количества NK-лимфоцитов и NKT-клеток оказалось равным 2,6. Некоторые авторы указывают, что снижение данного индекса при различных заболеваниях возможно за счет увеличения содержания NKT-лимфоцитов в периферической крови, что имеет прогностическое значение и делает актуальным определение этого соотношения у здоровых доноров [1, 21].

Ранее были исследованы основные перфорин-содержащие популяции лимфоцитов. Основными из них являются CD45⁺CD8⁺CD16⁺CD3⁺T-клетки (CTL), CD45⁺CD16⁺CD8⁺CD3⁺ лимфоциты (NK-клетки) и составляют 7,1±2,2 и 9,2±3,4% соответственно. Также, по данным

исследования, перфорин присутствует и в CD45⁺CD16⁺CD8⁺CD3⁺NKT-лимфоцитах [2].

Также было убедительно продемонстрировано изменение содержания перфорина в NK-клетках до и после взаимодействия с клетками-мишенями. При этом их количество не изменялось (16,7 и 17,0%), а истощение содержания внутриклеточного перфорина было показано с помощью показателя средней интенсивности флуоресценции (MFI). В процессе реакции он снижался примерно в два раза (со значения 40,45 до 22,13) [2]. В текущем исследовании мы показали, что перфорин содержится практически в 100% CD56^{dim}CD16^{dim} субпопуляции натуральных киллеров и отсутствует в CD56^{bright}CD16^{neg/low} клетках, что соответствует данным зарубежной литературы [6]. В работе впервые обнаружена субпопуляция NK-клеток с иммунофенотипом CD56^{dim}CD16^{dim}, не содержащая внутриклеточный перфорин (2,0%). В мировой научной литературе подобные сведения отсутствуют. Поскольку эти клетки представляют собой основной пул NK-лимфоцитов, то определение содержания в них внутриклеточного перфорина является важным показателем их способности к цитотоксичности.

Таким образом, широкое фенотипическое разнообразие NK- и NKT-клеток отражает их способность к реализации различной функциональной активности. Данное исследование, указывающее на высокую гетерогенность NK- и NKT-лимфоцитов, может послужить основой для изучения нарушений баланса между различными субпопуляциями этих клеток у онкологических больных.

Список литературы / References

1. Балмасова И.П., Ющук Н.Д., Знойко О.О., Шмелева Е.В., Дунда Н.И., Еремина О.Ф., Максимов С.Л., Зайцева М.Н., Малова Е.С., Сепиашвили Я.Р. Соотношение субпопуляций ЕК/ЕКТ как прогностический критерий хронического гепатита С // Аллергология и иммунология, 2009. Т. 10, № 3. С. 340-343. [Balmasova I.P., Yuschuk N.D., Znoiko O.O., Shmelyova E.V., Dunda N.I., Eryomina O.F., Maksimov S.L., Zaytseva M.N., Malova E.S., Sepiashvili Ya.R. NK/NKT ratio as a prognostic marker of chronic hepatitis C. *Allergologiya i immunologiya = Allergology and Immunology*, 2009, Vol. 10, no. 3, pp. 340-343. (In Russ.)]
2. Борунова А.А., Чкадуа Г.З., Заботина Т.Н. Перфорин-опосредованная цитотоксичность CD16⁺-лимфоцитов // Иммунология, 2006. Т. 27, № 1. С. 4-6. [Borunova A.A., Chkadua G.Z., Zabolitina T.N. Perforin-mediated cytotoxicity of CD16⁺-lymphocytes. *Immunologiya = Immunology*, 2006, Vol. 27, no.1, pp. 4-6. (In Russ.)]
3. Заботина Т.Н., Короткова О.В., Борунова А.А., Очеева Н.Ю., Бокин И.И., Жордания К.И., Паниченко И.В., Сельчук В.Ю., Кузнецов В.В., Кадагидзе З.Г. Субпопуляционная структура лимфоцитов у больных раком яичников // Вестник РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, 2010. Т. 21, № 1. С. 46-52. [Zabolitina T.N., Korotkova O.V., Borunova A.A., Ocheeva N.Yu., Bokin I.I., Zhordania K.I., Panichenko I.V., Selchuk V.Yu., Kuznetsov V.V., Kadagidze Z.G. Lymphocyte subset structure in patients with ovarian cancer. *Vestnik RONTs im. N.N. Blokhina RAMN = Journal of N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center*, 2010, Vol. 21, no. 1, pp. 46-52. (In Russ.)]

4. Короткова О.В., Заботина Т.Н., Скотаренко Л.В., Борунова А.А., Очеева Н.Ю., Воротников И.К., Кадагидзе З.Г. Субпопуляции лимфоцитов периферической крови больных РМЖ // Российский биотерапевтический журнал, 2011. Т. 10, № 3. С. 95-98. [Korotkova O.V., Zabolina T.N., Skotarenko L.V., Borunova A.A., Ocheeva N.Yu., Vorotnikov I.K., Kadagidze Z.G. Lymphocytes subpopulation from breast cancer patient's peripheral blood. *Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal = Russian Biotherapeutic Journal*, 2011, Vol. 10, no. 3, pp. 95-98. (In Russ.)]
5. Biron C.A., Nguyen K.B., Pien G.C., Cousens L.P., Salazar-Mather T.P. Natural killer cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, 1999, Vol. 17, pp. 189-220.
6. Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.*, 2001, Vol. 22, no. 11, pp. 633-640.
7. Cristiani C.M., Palella E., Sottile R., Talerico R., Garofalo C., Carbone E. Human NK Cell Subsets in Pregnancy and Disease: Toward a New Biological Complexity. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 656.
8. De Maria A., Bozzano F., Cantoni C., Moretta L. Revisiting human natural killer cell subset function revealed cytolytic CD56^{dim}CD16⁺ NK cells as rapid producers of abundant IFN- γ on activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, Vol. 108, no. 22, pp. 728-732.
9. Del Zotto G., Marcenaro E., Vacca P., Sivori S., Pende D., Della Chiesa M., Moretta F., Ingegnere T., Mingari M.C., Moretta A., Moretta L. Markers and function of human nk cells in normal and pathological conditions. *Cytometry B Clin Cytom.* 2017 Jan 5. doi: 10.1002/cyto.b.21508. [Epub ahead of print]
10. East J.E., Kennedy A.J., Webb T.J. Raising the Roof: The Preferential Pharmacological Stimulation of Th1 and Th2 Response Mediated by NKT Cells. *Med. Res. Rev.*, 2014, Vol. 34, no. 1, pp. 45-76.
11. Fauriat C., Long E.O., Ljunggren H.-G., Bryceson Y.T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 11, pp. 2167-2176.
12. Freud A.G., Caligiuri M.A. Human natural killer cell development. *Immunological Reviews*, 2006, Vol. 214, no. 1, pp. 56-72.
13. Gabrielli S., Ortolani C., Del Zotto G., Luchetti F., Canonico B., Buccella F., Artico M., Papa S., Zamai L. The Memories of NK Cells: Innate-Adaptive Immune Intrinsic Crosstalk. *J. Immunol. Res.*, 2016, Vol. 2016, 1376595. doi: 0.1155/2016/1376595. Epub 2016 Dec 19.
14. Gross C., Schulte-Mecklenbeck A., Wiendl H., Marcenaro E., Kerlero de Rosbo N., Uccelli A., Laroni A. Regulatory Functions of Natural Killer Cells in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 606.
15. Hazenberg M.D., Spits H. Human innate lymphoid cells. *Blood*, 2014, Vol. 124, no. 5, pp. 700-709.
16. Jiang Y., Cui X., Cui C., Zhang J., Zhou F., Zhang Z., Fu Y., Xu J., Chu Z., Liu J., Han X., Liao C., Wang Y., Cao Y., Shang H.. The Function of CD3⁺CD56⁺ NKT-Like Cells in HIV-Infected Individuals. *Biomed. Res. Int.*, 2014, 863625. Published online 2014 Mar 20.
17. Jiao Y., Huntington N.D., Belz G.T., Seillet C. Type 1 Innate Lymphoid Cell Biology: Lessons Learnt from Natural Killer Cells. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 426.
18. Lanier L.L. Shades of grey-the blurring view of innate and adaptive immunity. *Nature Reviews Immunology*, 2013, Vol. 13, no. 2, pp. 73-74.
19. Lanier L.L., Chang C., Azuma M., Ruitenberg J.J., Hemperly J.J., Phillips J.H. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N-CAM/CD56). *J. Immunol.*, 1991, Vol. 146, no. 12, pp. 4421-4426.
20. Littwitz-Salomon E., Dittmer U., Sutter K. Insufficient natural killer cell responses against retroviruses: how to improve NK cell killing of retrovirus-infected cells. *Retrovirology*, 2016, Vol. 13, p. 77.
21. Lundgren S., Warfvinge C.F., Elebro J., Heby M., Nodin B., Krzyzanowska A., Bjartell A., Leandersson K., Eberhard J., Jirström K. The Prognostic Impact of NK/NKT Cell Density in Periapillary Adenocarcinoma Differs by Morphological Type and Adjuvant Treatment. *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 6, e0156497. doi: 10.1371/journal.pone.0156497.
22. Mace E.M., Orange J.S. Genetic Causes of Human NK Cell Deficiency and Their Effect on NK Cell Subsets. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 545.
23. Moretta A., Bottino C., Vitale M., Pende D., Cantoni C., Mingari M.C. Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.*, 2001, Vol. 19, pp. 197-223.
24. Nowak M., Schmidt-Wolf I.G.H. Natural Killer T Cells Subsets in Cancer, Functional Defects in Prostate Cancer and Implications for Immunotherapy. *Cancers (Basel)*, 2011, Vol. 3, no. 3, pp. 3661-3675.
25. Pesce S., Moretta L., Moretta A., and Marcenaro E. Human NK Cell Subsets Redistribution in Pathological Conditions: A Role for CCR7 Receptor. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 7, p. 414.

26. Poli A., Michel T., Thérésine M., Andrès E., Hentges F., Zimmer J. CD56^{bright} natural killer (NK) cells: an important NK cell subset. *Immunology*, 2009, Vol. 126, no. 4, pp. 458-465.
27. Shevtsov M., Multhoff G. Immunological and Translational Aspects of NK Cell-Based Antitumor Immunotherapies. *Front. Immunol.*, 2016, Vol. 11, no. 7, p. 492.
28. Viale R., Ware R., Maricic I., Chaturvedi V., Kumar V. NKT Cell Subsets Can Exert Opposing Effects in Autoimmunity, Tumor Surveillance and Inflammation. *Curr. Immunol. Rev.*, 2012, Vol. 8, no. 4, pp. 287-296.
29. Zamai L., Del Zotto G., Buccella F., Galeotti L., Canonico B., Luchetti F., Papa S. Cytotoxic functions and susceptibility to apoptosis of human CD56bright NK cells differentiated in vitro from CD34⁺ hematopoietic progenitors. *Cytometry Part A*, 2012, Vol. 81, no. 4, pp. 294-302.

Авторы:

Табакон Д.В. — научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Заботина Т.Н. — д.б.н., ведущий научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Борунова А.А. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Панчук И.О. — ординатор, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Короткова О.В. — к.м.н., старший научный сотрудник, лаборатория клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Кадагидзе З.Г. — д.м.н., профессор, заведующая централизованным клинико-лабораторным отделом и лабораторией клинической иммунологии опухолей, Научно-исследовательский институт клинической онкологии ФГБУ «Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Tabakov D.V., Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Zabotina T.N., PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Borunova A.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Panchuk I.O., Resident Physician, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Korotkova O.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Kadagidze Z.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Centralized Clinical Laboratory Department, Laboratory of Clinical Immunology of Tumors, Research Institute of Clinical Oncology, N. Blokhin Research Center for Oncology, Moscow, Russian Federation

Поступила 09.02.2017
Принята к печати 22.02.2017

Received 09.02.2017
Accepted 22.02.2017

ИЗМЕНЕНИЕ УРОВНЯ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК И Т-ХЕЛПЕРОВ 17 В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВОЗРАСТА

Топтыгина А.П.^{1,4}, Семикина Е.Л.^{2,5}, Петричук С.В.², Закиров Р.Ш.², Курбатова О.В.², Копыльцова Е.А.², Комах Ю.А.³

¹ ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

³ ФГАУ «Межотраслевой научно-технический комплекс „Микрохирургия глаза“ им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Резюме. Возрастная динамика формирования Th17 и Treg у здоровых людей недостаточно изучена. Целью настоящего исследования было изучить количественные характеристики субпопуляций Th17 и Treg у здоровых людей в зависимости от возраста.

Было обследовано 352 человека (168 лиц женского пола и 184 — мужского), в возрасте от 1 месяца до 85 лет, в том числе младше 1 года — 79, в возрасте 1–2 года 11 мес. — 34, 3–4 года 11 мес. — 24, 5–6 лет 11 мес. — 28, 7–8 лет 11 мес. — 25, 9–11 лет 11 мес. — 36, 12–14 лет 11 мес. — 39, 15–18 лет — 26, 20–35 лет — 25, 36–49 лет — 11, 50–70 лет — 16 и в возрасте более 70 лет — 9 человек. У детей в возрасте до 2 лет исследование проводилось из капиллярной крови, в более старшем возрасте — из венозной. Определение субпопуляций лимфоцитов крови проводили методом проточной цитофлуорометрии с четырехцветным окрашиванием в реакции прямой иммунофлуоресценции. Окрашивание проводили в цельной крови с последующим лизированием эритроцитов. Для определения субпопуляций лимфоцитов использовали следующие поверхностные маркеры: CD3, CD4, CD8, CD25, CD127, CD161, CD45R0.

Показано, что процент Treg в гейте CD3⁺CD4⁺ практически не зависит от возраста обследуемых лиц и аппроксимируется линейной функцией. В абсолютном выражении уровень Treg в детском возрасте прогрессивно снижается и после 10 лет выходит на плато и аппроксимируется логарифмической кривой. При исследовании возрастной динамики уровня Th17 обнаружен устойчивый рост этой субпопуляции как в процентном, так и в абсолютном выражении. Процент этих клеток от гейта CD3⁺CD4⁺ и абсолютное количество аппроксимируется квадратными уравнениями. Возраст 10–12 лет является, по-видимому, критическим в процессе формирования иммунной системы, к этому возрасту завершаются основные процессы развития различных звеньев иммунитета и дальше происхо-

Адрес для переписки:

Топтыгина Анна Павловна
ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора
125212, Россия, Москва, ул. Адмирала Макарова, 10.
Тел.: 8 (495) 452-18-01.
Факс: 8 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Address for correspondence:

Toptygina Anna P.
G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology
125212, Russian Federation, Moscow,
Admiral Makarov str., 10.
Phone: 7 (495) 452-18-01.
Fax: 7 (495) 452-18-30.
E-mail: toptyginaanna@rambler.ru

Образец цитирования:

А.П. Топтыгина, Е.Л. Семикина, С.В. Петричук, Р.Ш. Закиров, О.В. Курбатова, Е.А. Копыльцова, Ю.А. Комах «Изменение уровня субпопуляций Т-регуляторных клеток и Т-хелперов 17 в периферической крови здоровых людей в зависимости от возраста» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 409–420. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420

© Топтыгина А.П. и соавт., 2017

For citation:

A.P. Toptygina, E.L. Semikina, S.V. Petrichuk, R.Sh. Zakirov, O.V. Kurbatova, E.A. Kopyltsova, Yu.A. Komakh "Age-dependent changes of T-regulatory and Th17 subset levels in peripheral blood from healthy humans", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 409–420. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-409-420

дит их созревание. В старшем возрасте (70 лет и более) выявлено снижение как процента в составе Т-хелперов, так и абсолютного уровня Treg и Th17-лимфоцитов. Предложенные значения процентного и абсолютного количества клеток субпопуляций Treg и Th17 в периферической крови здоровых людей могут быть использованы в качестве возрастных норм для этих субпопуляций.

Ключевые слова: Treg, Th17, возрастные нормы, субпопуляции лимфоцитов, субпопуляции CD4⁺ лимфоцитов

AGE-DEPENDENT CHANGES OF T-REGULATORY AND Th17 SUBSET LEVELS IN PERIPHERAL BLOOD FROM HEALTHY HUMANS

Toptygina A.P.^{a,b}, Semikina E.L.^{b,e}, Petrichuk S.V.^b, Zakirov R.Sh.^b, Kurbatova O.V.^b, Kopyltsova E.A.^b, Komakh Yu.A.^c

^a G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation

^b Federal Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

^c The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

^d M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

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

Abstract. Age-dependent development of Th17 and Treg lymphocyte subsets in healthy humans is studied insufficiently. The present study aimed to investigate quantitative characteristics of Th17 and Treg subsets in peripheral blood of healthy subjects for various age groups.

352 healthy humans (168 female and 184 male), one month to 85 years old, were subject to examination, including 79 infants in their first year of life; 34 children at aged 1 year to 2 years 11 months; 24, at 3 to 4 years 11 months; 28, at the age of 5 to 6 years 11 months; 25 children aged 7-8 years 11 month; 36 children aged 9 to 11 years 11 months; 39 adolescents aged 12 to 14 years 11 months; 26 adolescents aged 15 to 18 years; 25 young adults aged 20 to 35 years; 11 adults at 36 to 49 years old; 16 adults aged 59-70 years, and 9 elderly people over 70 years old. The study was performed with capillary blood in children under 2 years, and venous blood taken in elder persons. The basic and 'minor' subsets of peripheral blood lymphocytes were evaluated by flow cytometry using four-color staining of whole blood and following erythrocyte lysis. We used the following surface markers: CD3, CD4, CD8, CD25, CD127, CD161, CD45R0 for lymphocyte subsets detection.

It has been shown that Treg percentage (a ratio of CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/neg} in the CD3⁺CD4⁺ gate) did not depend on age of the people under study, and can be approximated by a linear function. The absolute number of Tregs in childhood is progressively decreased and, after 10 years old, it reaches plateau values. This age-dependent relationship may be approximated by a logarithmic function. Evaluation of Th17 subset levels demonstrated a strong relative and absolute age-dependent growth of this cell subpopulation. Percentage and absolute numbers of Th17 lymphocyte (share of CD4⁺CD161⁺CD45R0⁺ in the CD3⁺CD4⁺gate), can be approximated by a square function. The age of 10-12 years seems to be critical to the immune system formation. We suppose the process of the immune system development to be completed at this age, and maturation of the immune cell populations is then observed. A decrease in both relative and absolute numbers of Treg and Th17 lymphocyte subsets was found in elderly persons (> 70 years old). Our data on peripheral blood Tregs and Th17 subsets, with respect to their percentage and absolute numbers in healthy humans, may be used as age-related reference values.

Keywords: Treg, Th17, CD4⁺ lymphocytes, lymphocytes subsets, normal ranges

Введение

Предложенная в 1986 Mosman and Coffman [21] парадигма Th1/Th2 оказала серьезное воздействие на направления исследований в иммунологии последней четверти XX века, однако оказалась лишь частным случаем: субпопуляций

CD4⁺ лимфоцитов оказалось существенно больше. К настоящему моменту идентифицированы следующие субпопуляции Т-хелперов (Th): Th1, Th2, Th9, Th17, Th22, фолликулярные Т-хелперы (Tfh) и регуляторные Т-клетки (Treg). Роль и взаимодействие Th1- и Th2-лимфоцитов в иммунном ответе достаточно подробно изучены, тогда

как другая альтернативная пара: Th17/Treg все еще остается под пристальным вниманием ученых. Субпопуляция Th17-лимфоцитов регулирует противобактериальный и противогрибковый иммунный ответ и активирует нейтрофилы, однако, может поддерживать аутоиммунные заболевания [17]. Главным транскрипционным фактором для субпопуляции Th17 человека является RORC2, а основными цитокинами признаны провоспалительные интерлейкины (IL): IL-17A, IL-21 и IL-22 [24]. Одной из важных поверхностных молекул, характерных для Th17, является CD161, а также хемокиновый рецептор CCR6 [11].

Еще до открытия Т-регуляторных (Treg) клеток накапливались данные о существовании регуляторной субпопуляции, действие которой связано с рецептором к IL-2. При изучении механизмов действия алкилирующих метаболитов циклофосамида, которые в супернизких дозах блокируют рецептор для IL-2, отмечено парадоксальное повышение пролиферативной активности лимфоцитов в ответ на митоген (ФГА): пролиферативная активность обработанных алкилирующим препаратом лимфоцитов превышала уровень пролиферации необработанных клеток [3, 23]. После открытия Sakaguchi и Руденским FoxP3⁺Т-регуляторных клеток [14, 25], выживание которых было обусловлено высокой экспрессией рецептора к IL-2, стало понятно, что такой эффект мог быть достигнут, только если блокировка алкилирующими метаболитами циклофосамида рецептора к IL-2 инактивировала эти регуляторные клетки, изначально присутствовавшие в популяции лимфоцитов периферической крови и контролировавшие высоту пролиферативного ответа на ФГА.

Принято выделять натуральные и индуцированные Т-регуляторные лимфоциты и те и другие экспрессируют FoxP3 [8, 14]. Натуральные (центральные) Treg (nTreg), образуются в тимусе и обеспечивают контроль за аутоагрессивными процессами. Индуцированные (периферические) Treg (iTreg) образуются из наивных CD4⁺ лимфоцитов и отвечают за поддержание толерантности к антигенам пищи, симбионтов, аллогенного плода при беременности, они же ограничивают иммунный ответ после элиминации возбудителя. Первоначально мембранным фенотипом Treg считали экспрессию CD4⁺CD25^{+(hi)}. Однако вскоре было показано, что эта субпопуляция неоднородна. В ней можно выделить активированные хелперы (CD4⁺CD25⁺CD127^{hi}) и Treg с низкой экспрессией CD127 (α-цепь рецептора для IL-7) [26].

В процессе постнатального развития происходят длительные процессы формирования многих звеньев иммунной системы, в том числе системы клеточного иммунитета. Если nTreg образуются в тимусе еще до рождения ребенка, то iTreg формируются под воздействием антигенов пищи и микроорганизмов. В формировании субпопуляции Th17 поступающие извне антигены играют основную роль. Этот процесс продолжается в течение всей жизни. Дополнительные изменения вносят различные заболевания. Возрастная динамика формирования Th17 и Treg у здоровых людей недостаточно изучена. **Целью настоящего исследования** было изучить количественные характеристики субпопуляций Th17 и Treg у здоровых людей в зависимости от возраста.

Материалы и методы

Было обследовано 352 человека (168 лиц женского пола и 184 — мужского), в возрасте от 1 месяца до 85 лет, в том числе младше 1 года — 79, в возрасте 1-2 года 11 мес. — 34, 3-4 года 11 мес. — 24, 5-6 лет 11мес. — 28, 7-8 лет 11 мес. — 25, 9-11 лет 11мес. — 36, 12-14 лет 11 мес. — 39, 15-18 лет — 26, 20-35 лет — 25, 36-49 лет — 11, 50-70 лет — 16 и в возрасте более 70 лет — 9 человек. Исследование выполнено при проведении профилактических осмотров и ежегодной диспансеризации, по результатам которых подтверждено отсутствие острых и хронических иммуноопосредованных заболеваний у всех обследованных. Полученные в результате лабораторного обследования показатели общего анализа крови, процентный и абсолютный состав основных субпопуляций лимфоцитов крови и показатели гуморального иммунитета находились в пределах возрастных норм, что позволило охарактеризовать когорту обследованных как «здоровые люди».

У детей в возрасте до 2 лет исследование проводилось из капиллярной крови, в более старшем возрасте — из венозной, взятие крови утром натощак из локтевой вены 2 мл в пробирку с ЭДТА.

Иммунофенотипирование лимфоцитов крови проводили методом проточной цитофлюорометрии с четырехцветным окрашиванием в реакции прямой иммунофлюоресценции. Окрашивание проводили в цельной крови с последующим лизированием эритроцитов [6]. Использовали технологию и реактивы BD Biosciences (США) — проточный цитометр FASCalibur, BDFacsCantoII, программу сбора и обработки информации CellQuest, FACSDiva. Выделение лимфоидного региона проводилось по показателям прямого и бокового светорассеяния с учетом экспрес-

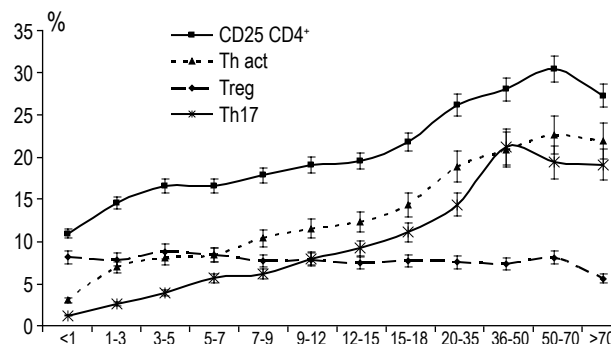
сии CD45 (графики CD45/SSC и FSC/SSC). Для определения субпопуляций лимфоцитов использовали следующие поверхностные маркеры: CD3, CD4, CD8, CD25, CD127, CD161, CD45R0. Анализ данных иммунофлуоресценции включал комплекс показателей. Оценивался общий уровень Т-клеток CD3⁺, Т-хелперов CD3⁺CD4⁺ и Т-цитотоксических CD3⁺CD8⁺ лимфоцитов (процент в составе лимфоцитов и абсолютное число); а также распределение субпопуляций с различным иммунофенотипом среди CD3⁺CD4⁺ – клеток: общий уровень лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD25⁺ с разделением на субпопуляции активированных Т-хелперов CD3⁺CD4⁺CD25⁺CD127^{hi} и Т-регуляторных клеток CD3⁺CD4⁺CD25^{hi}CD127^{low/neg}; и уровень Th17-лимфоцитов с фенотипом CD3⁺CD4⁺CD161⁺CD45R0⁺, для этих популяций оценивался их процент в составе всех Т-хелперов (в гейте CD3⁺CD4⁺), а также абсолютные числа.

Полученные результаты обработали методами вариационной статистики (программные пакеты Statistica и Microsoft Excel). Для каждого показателя была подтверждена статистическая гипотеза о нормальности распределения данных по критерию о равенстве дисперсий. Вычисляли среднюю арифметическую и ее стандартную ошибку ($M \pm SE$), различия между группами оценивали с помощью параметрического t-критерия. Уровень $p < 0,05$ считали значимым. Для выявления корреляций между различными признаками использовали критерий Пирсона.

Результаты

Средние значения содержания основных субпопуляций лимфоцитов в периферической крови людей разного возраста представлены в таблице 1. Абсолютное количество лимфоцитов в периферической крови максимально у детей первого года жизни и постепенно снижается, выходя на плато после 10 лет. При этом коэффициент корреляции Пирсона для всех возрастов $r = -0,46$, то есть корреляция слабая, тогда как для детей до 10 лет $r = -0,70$, то есть сильная отрицательная корреляция с возрастом. Аналогичные зависимости были выявлены для абсолютных значений таких крупных субпопуляций лимфоцитов, как Т-лимфоциты (CD3⁺) для всех возрастов $r = -0,38$, а для детей до 10 лет $r = -0,67$; Т-хелперы (CD4⁺) для всех возрастов $r = -0,38$, а для детей до 10 лет $r = -0,69$; и, в меньшей степени, для цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8⁺) для всех возрастов $r = -0,35$, а для детей до 10 лет $r = -0,44$. Процентное соотношение основных

А (А)



Б (Б)

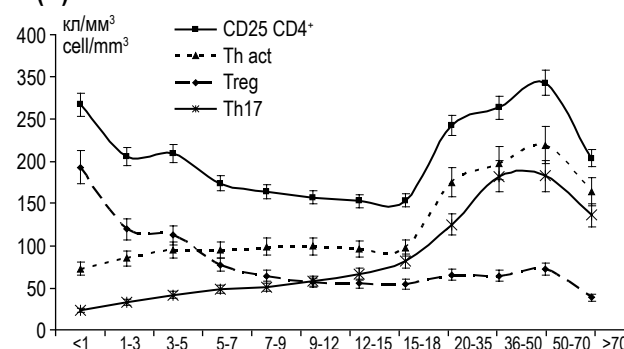


Рисунок 1. Возрастная динамика малых субпопуляций CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов в периферической крови здоровых людей ($M \pm SE$)

Примечание. А – процент в гейте CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов; Б – абсолютные показатели в мм³. По оси абсцисс – возраст в годах.

Figure 1. Age dependent dynamics of CD3⁺CD4⁺ lymphocyte subsets in peripheral blood of healthy humans ($M \pm SE$)

Note. (A) percent in gate of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes. (B) absolute number (mm³). Abscissa – number of years.

субпопуляций лимфоцитов в меньшей степени зависело от возраста, и значимых корреляций выявлено не было.

Существенно более интересные соотношения были выявлены при анализе возрастной динамики малых субпопуляций CD4⁺ лимфоцитов (см. табл. 2). Первоначально за субпопуляцию Treg принимали CD4⁺CD25⁺ лимфоциты. Уровень этой субпопуляции в процентах от гейта CD3⁺CD4⁺ продемонстрировал сильную положительную корреляцию с возрастом ($r = 0,69$), однако в абсолютном количестве такая зависимость терялась. На рисунке 1Б видно, что зависимость этого показателя от возраста имеет сложный профиль. Позднее было показано, что субпопуляция CD4⁺CD25⁺ включает в себя по меньшей мере 2 субпопуляции: активированные Т-хелперы (Th_{act}) с фенотипом CD4⁺CD25⁺CD127^{hi} и Treg

с фенотипом $CD4^+CD25^+CD127^{neg/lo}$. Раздельный анализ этих субпопуляций выявил интересные закономерности (см. рис. 1). Так, субпопуляция Th_{act} и в процентном ($r = 0,74$) и в абсолютном ($r = 0,64$) выражении продемонстрировала сильную положительную корреляцию с возрастом. При этом субпопуляция Treg в процентном выражении от гейта $CD3^+CD4^+$ составляла 7-8% независимо от возраста. Значимое снижение до 5,42% было выявлено лишь в группе сильно пожилых лиц, средний возраст 79,4 года ($p < 0,05$). Абсолютное количество Treg постепенно снижалось, выходя на плато в возрасте около 10 лет на уровне 65-75 кл/мм³. В старшей возрастной группе также было обнаружено значимое снижение абсолютного количества Treg до уровня 45,4 кл/мм³ ($p < 0,05$). Выявлена отрицательная корреляция с возрастом $r = -0,38$, а для детей до 10 лет $r = -0,62$. При этом абсолютное количество Treg продемонстрировало тесную положительную корреляцию с абсолютным количеством лимфоцитов и абсолютным количеством $CD3^+CD4^+$ лимфоцитов в крови в зависимости от возраста ($r = 0,87$ и $r = 0,89$ соответственно).

Анализ уровня Th17 свидетельствует о сильной положительной связи между возрастом и уровнем лимфоцитов этой субпопуляции в крови — как в абсолютном, так и в процентном выражении, коэффициент корреляции Пирсона составил 0,74 и 0,82 соответственно. При этом на графиках хорошо заметен параллелизм между изменениями уровней субпопуляций Th_{act} и Th17, как в процентном выражении, так и в абсолютных показателях, проявляющийся в сильной положительной корреляции ($r = 0,76$ и $r = 0,64$ соответственно).

К настоящему времени известно, что Th17-лимфоциты также неоднородны: субпопуляции $CD4^+CD161^+$ присутствуют как $CD45R0^+$, так и $CD45RA^+$ лимфоциты. При этом первый вариант фенотипа рассматривается как зрелые Th17-клетки, а второй — как лимфоциты, способные дифференцироваться в Th17. Оказалось, что уровень этих субпопуляций линейно зависит от возраста исследуемого человека (рис. 2). Процент $CD45R0$ в составе $CD4^+CD161^+$ менялся от 24,7% у детей до года до 93,3% у пожилых людей старше 70 лет. Следовательно, у людей разного возраста количество зрелых Th17 в субпопуляции $CD4^+CD161^+$ различается, поэтому не следует исключать маркер $CD45R0$ при анализе субпопуляции Th17, ибо это может привести к существенным искажениям, особенно в разных возрастных группах.

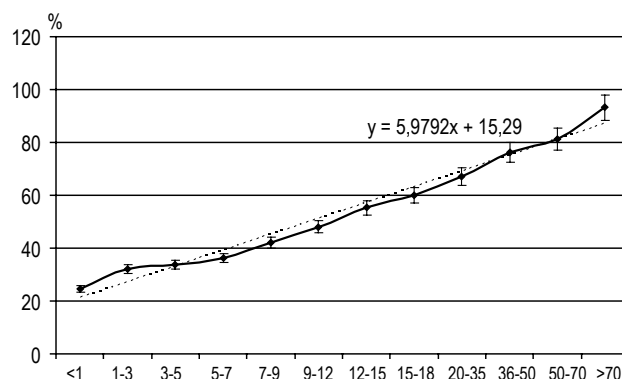


Рисунок 2. Процент лимфоцитов периферической крови здоровых людей, экспрессирующих молекулу $CD45R0$ в гейте $CD4^+CD161^+$ ($M \pm SE$)

Примечание. По оси абсцисс — возраст в годах. Пунктирной линией обозначен график аппроксимации, представлена формула графика аппроксимации.

Figure 2. Percentage of peripheral blood lymphocytes expressing $CD45R0$ in gate $CD4^+CD161^+$ ($M \pm SE$)

Note. Abscissa — number of years. Approximation line is shown by dotted curve.

Обсуждение

Целью нашей работы было изучение динамики количественных характеристик субпопуляций Th17 и Treg у здоровых людей в зависимости от возраста. В результате проведенной работы нам удалось показать, что процент Treg в гейте $CD3^+CD4^+$ практически не зависит от возраста обследуемых лиц и значимо снижается лишь в очень пожилом возрасте. В абсолютном выражении уровень Treg в детском возрасте прогрессивно снижается и после 10 лет выходит на плато и также снижается в старшей возрастной группе (средний возраст 79,4 года). Зависимость абсолютного количества Treg в мм³ крови аппроксимируется логарифмической кривой (рис. 3). Величина достоверности аппроксимации R^2 составила 0,85, что говорит о хорошей степени соответствия модели. Снижение общего количества лимфоцитов в периферической крови здоровых лиц в зависимости от возраста, а так же их субпопуляций $CD3^+$ и $CD3^+CD4^+$ также подчиняется логарифмической зависимости ($R^2 = 0,93$; 0,88 и 0,81 соответственно). Относительный уровень Treg лучше всего аппроксимируется линейной функцией (см. рис. 3). Наши результаты хорошо согласуются с результатами контрольных групп здоровых доноров, представленных в работах разных авторов, исследовавших Treg в крови людей разных возрастов [1,16]. В то же время старшая возрастная группа вызвала не-

ТАБЛИЦА 1. СОСТАВ ОСНОВНЫХ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ ЗДОРОВЫХ ЛЮДЕЙ (ПРОЦЕНТ В ЛИМФОИДНОМ ГЕЙТЕ И АБСОЛЮТНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ)

TABLE 1. MAJOR SUBSETS OF T-LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD OF HEALTHY HUMANS (PERCENTAGE AND ABSOLUTE NUMBERS IN "LYMPHOID" GATE)

Возраст Age	Лимфоциты Lymphocytes (abs)	CD3 %	CD3 abs	CD4 %	CD4 abs	CD8 %	CD8 abs	CD4/CD8
до 1 г. under 1 year	5838,22±176,12	67,65±0,85	4225,52±150,35	49,22±0,89	2893,62±113,69	17,21±0,43	1055,32±38,56	3,23±0,09
1-2 г. 11 мес. 1-2 years 11 months	4327,96±227,68	65,78±1,13	2854,64±169,71	40,38±1,05	1766,92±118,55	20,77±0,71	900,18±61,77	1,98±0,07
3-4 г. 11 мес. 3-4 years 11 months	3901,24±257,14	68,91±1,63	2712,36±180,03	38,94±1,75	1528,19±130,88	24,55±1,18	952,30±63,28	1,66±0,12
5-6 л. 11 мес. 5-6 years 11 months	2920,15±170,85	67,43±1,28	1918,52±107,13	38,18±0,98	1090,54±53,76	23,41±0,78	674,08±47,35	1,67±0,07
7-8 л. 11 мес. 7-8 years 11 months	2594,99±157,65	69,63±1,25	1793,36±106,86	37,71±1,33	956,90±48,51	24,88±1,18	660,46±62,05	1,57±0,09
9-11 л. 11 мес. 9-11 years 11 months	2444,88±93,07	68,92±1,27	1696,79±79,37	36,58±0,91	894,08±38,94	26,47±1,02	658,37±42,35	1,45±0,07
12-14 л. 11 мес. 12-14 years 11 months	2233,54±80,11	70,57±1,06	1565,73±60,55	39,01±1,11	866,06±35,73	27,31±0,81	613,71±30,25	1,48±0,06
15-18 л. 15-18 years	1963,03±82,28	69,64±1,11	1363,73±59,22	42,18±1,05	832,72±45,53	23,45±0,68	454,24±21,98	1,84±0,08
20-35 л. 20-35 years	2291,39±90,94	72,86±1,35	1723,89±77,16	42,31±1,44	982,26±60,72	26,08±1,12	614,37±32,57	1,71±0,09
36-50 л. 36-50 years	2119,16±160,16	76,70±1,45	1627,96±127,73	47,20±1,22	1001,66±85,52	29,09±1,66	612,07±52,41	1,69±0,13
50-70 л. 50-70 years	2269,86±151,37	72,98±1,93	1671,84±136,40	49,14±1,57	1126,18±101,28	23,65±1,93	537,70±51,49	2,34±0,23
более 70 л. over 70 years	2103,03±208,01	70,16±3,27	1452,48±127,73	40,04±2,33	846,15±82,31	24,47±3,38	482,64±43,38	1,85±0,23

ТАБЛИЦА 2. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ СУБПОПУЛЯЦИЙ Т-ЛИМФОЦИТОВ (В ГЕЙТЕ CD3⁺CD4⁺)
TABLE 2. DISTRIBUTION OF T-LYMPHOCYTE SUBSETS (DETECTED IN CD3⁺CD4⁺ GATE)

Возраст Age	CD25 ⁺ CD4 ⁺ %**	CD25 ⁺ CD4 ⁺ abs	Th act %	Th act abs	Treg %	Treg abs	Th17 %	Th17 abs
до 1 г. under 1 year	10,74±0,26	305,81±10,32	2,81±0,25	84,53±5,23	7,93±0,17	221,28±8,27	1,01±0,08	28,21±1,83
1-2 г. 11 мес. 1-2 years 11 months	14,39±0,75	236,18±22,85	6,73±0,53	98,53±8,68	7,66±0,47	137,64±12,52	2,43±0,22	39,34±3,11
3-4 г. 11 мес. 3-4 years 11 months	16,46±0,93	240,02±18,61	7,84±0,61	110,25±10,62	8,62±0,75	129,78±12,69	3,66±0,35	49,17±4,32
5-6 л. 11 мес. 5-6 years 11 months	16,43±0,51	199,71±11,34	8,19±0,48	109,95±6,12	8,24±0,40	89,76±7,77	5,46±0,44	57,21±4,83
7-8 л. 11 мес. 7-8 years 11 months	17,73±0,83	188,64±8,43	10,21±0,56	114,05±4,73	7,52±0,41	74,59±5,20	5,94±0,51	59,62±5,30
9-11 л. 11 мес. 9-11 years 11 months	18,97±0,94	180,66±7,52	11,35±0,68	114,72±4,66	7,63±0,32	65,94±3,49	7,76±0,65	67,28±6,18
12-14 л. 11 мес. 12-14 years 11 months	19,43±0,81	175,94±11,55	12,16±0,62	111,26±7,51	7,26±0,31	64,69±4,24	9,02±0,89	77,11±6,71
15-18 л. 15-18 years	21,64±1,02	176,31±13,44	14,13±1,01	112,67±10,01	7,51±0,38	63,64±4,74	10,89±1,10	95,01±7,67
20-35 л. 20-35 years	26,08±1,45	277,76±21,15	18,75±1,28	201,32±17,61	7,33±0,56	76,44±7,20	14,22±1,22	144,04±8,92
36-50 л. 36-50 years	27,92±2,87	301,83±49,86	20,74±2,47	227,07±41,04	7,18±0,67	74,76±7,18	21,05±1,80	209,08±18,04
50-70 л. 50-70 years	30,39±1,76	335,47±29,45	22,51±1,61	251,33±24,17	7,87±0,71	84,13±7,65	19,24±1,23	209,71±18,54
более 70 л. over 70 years	27,20±2,32	233,73±21,42	21,78±1,13	188,30±18,79	5,42±0,57	45,43±4,09	18,98±1,88	156,82±15,38

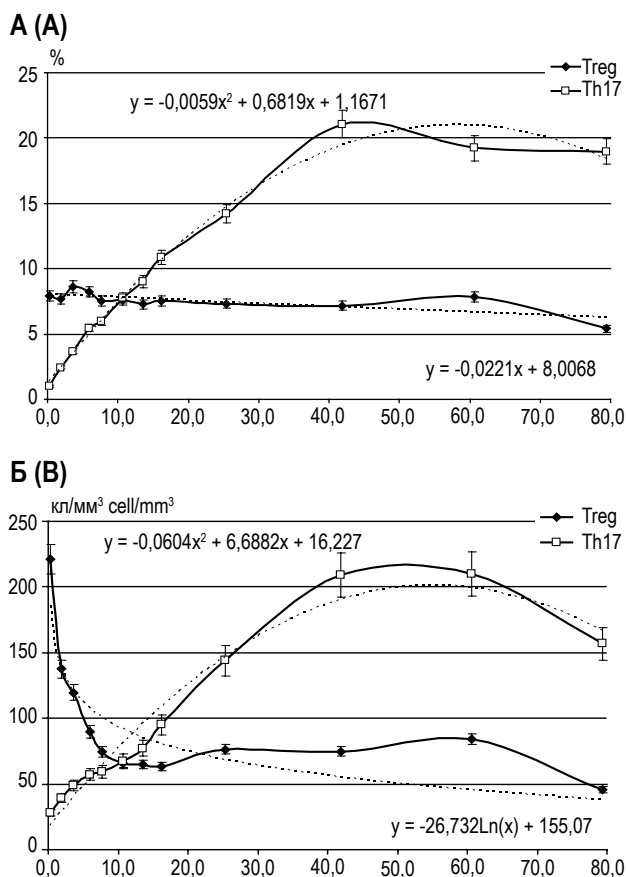


Рисунок 3. Аппроксимация графиков возрастной динамики субпопуляций Treg и Th17 периферической крови здоровых людей (M±SE)

Примечание. А – процент в гейте CD3⁺CD4⁺ лимфоцитов. Б – абсолютные показатели в мм³. По оси абсцисс – возраст в годах. Пунктирной линией обозначены графики аппроксимации, представлены формулы графиков аппроксимации.

Figure 3. Approximation of age dependent dynamics of Treg and Th17 subsets in peripheral blood of healthy humans (M±SE)

Note. (A) percentage in gate of CD3⁺CD4⁺ lymphocytes. (B) absolute number (mm³). Abscissa – number of years. Approximation line is shown by dotted curve.

которые затруднения при интерпретации результатов. Существует мнение, что по мере старения организма происходит увеличение количества Treg [15, 18, 28]. Однако обращает на себя внимание тот факт, что Treg в этих работах измеряли как CD4⁺CD25⁺ лимфоциты, не учитывая экспрессию CD127. В настоящее время хорошо известно, что в субпопуляции CD4⁺CD25⁺ присутствуют как Treg (CD4⁺CD25⁺CD127^{neg/lo}), так и активированные хелперы (CD4⁺CD25⁺CD127^{hi}). Для людей сильно пожилого возраста типично наличие хронических воспалительных, в том числе и аутоиммунных заболеваний [9], что, скорее, могло бы свидетельствовать о недостатке Treg.

По-видимому, в анализируемых работах под видом Treg учитывали сумму Th_{act} и Treg. Как нами было показано, количество Th_{act} прогрессивно нарастает с возрастом, а Treg немного снижается, поэтому сумма могла давать более высокие значения, чем у лиц молодого возраста. Использование маркера CD127 позволяет разделить эти субпопуляции и исключить суммирование результатов. Более того, субпопуляция Treg также неоднородна, в ней выделяют образующиеся в тимусе nTreg и индуцируемые на периферии iTreg. Их функции перекрываются лишь в части торможения аутоиммунного ответа. По-видимому, с возрастом меняется соотношение этих двух субпопуляций, хотя бы уже потому, что активность тимуса весьма высока в первые 10–12 лет жизни и постепенно снижается к старческому возрасту. Логично было бы предположить, что сразу после рождения субпопуляция Treg представлена в основном тимическими Treg, а в старости, напротив – iTreg. Тем не менее на мышах было показано, что у старых животных, напротив, отмечается повышение nTreg и снижение уровня iTreg [10]. К сожалению, мнение о том, что мыши являются хорошей моделью для изучения возрастных изменений в иммунной системе, не подтвердилось. Так, в частности, было показано, что даже у очень старых мышей тимус работает весьма эффективно и поддержание пула Т-лимфоцитов даже у таких животных осуществляется за счет мигрантов из тимуса, тогда как у человека в сильно пожилом возрасте поддержание пула Т-клеток происходит, в основном, за счет гомеостатической пролиферации [12], поэтому невозможно переносить данные, полученные на мышах, на человека. В литературе есть сведения о том, что сразу после рождения субпопуляция Treg представлена натуральными Treg, а дальше начинают появляться и индуцированные на периферии Treg, однако такие исследования отрывочные и ограничены в сроках наблюдения 3-мя годами, что слишком мало для понимания процессов протяженностью в человеческую жизнь [16].

При исследовании возрастной динамики уровня Th17 обнаружен устойчивый рост этой субпопуляции как в процентном, так и в абсолютном выражении. И это несмотря на то, что общее количество лимфоцитов в периферической крови здоровых лиц в зависимости от возраста, а также их субпопуляций CD3⁺ и CD3⁺CD4⁺ постепенно снижается, а в процентном выражении практически не меняется. Исследование зависимости уровня Th17 от возраста выявило, что и процент этих клеток от гейта CD3⁺CD4⁺,

и абсолютное количество аппроксимируется квадратными уравнениями (рис. 3). Величина достоверности аппроксимации R^2 составила 0,98 и 0,96 соответственно, что говорит об очень высокой степени соответствия модели. Обнаружен параллелизм между увеличением с возрастом уровня Th17 и активированных хелперов (Th_{act}). Нам не удалось найти исследования, прослеживающего изменения уровня Th17 от рождения и до очень пожилого возраста, однако наши данные хорошо коррелируют с уровнем Th17 в контрольных группах в многочисленных исследованиях субпопуляции Th17 при различных заболеваниях у людей разного возраста [13, 19, 20, 27]. У здоровых детей грудного и младшего возраста Th17 определяются на уровне 1-3% [13, 19], а у пожилых людей их количество прогрессивно нарастает с возрастом [27]. Однако сопоставление данных литературы осложняется тем, что в разных работах применяли разные способы детекции Th17-лимфоцитов. Кроме CD161-маркера, использовали также хемокиновый рецептор CCR6 или внутриклеточное окрашивание на IL-17A, при этом полученные данные могут существенно различаться.

Многие авторы для анализа баланса иммунной системы предлагают использовать отношение Treg/Th17 [13, 19, 20, 27]. Мы провели соответствующие расчеты. Зависимость отношения Treg/Th17 хорошо аппроксимируется степенной функцией (см. рис. 4), достоверность аппроксимации $R^2 = 0,98$, что свидетельствует об очень высокой степени соответствия модели. Большинство авторов отмечает увеличение уровня Th17 при изучаемой ими патологии, или, по крайней мере, уменьшение отношения Treg/Th17 [2, 13, 19, 20, 27]. Мы также исследовали детей с заболеваниями различной этиологии, в основе которых лежит воспаление, и всякий раз обнаруживали повышение уровня Th17 (неопубликованные данные). Иными словами, уровень Th17 у больных людей соответствовал более «взрослому» нормативам. В англоязычной литературе такое явление именуют термином Premature Aging – преждевременное старение [22]. Более того, в гейте $CD4^+CD161^+$ резко возрастает количество $CD45RO^+$ лимфоцитов, что типично для сильно пожилых людей (см. рис. 2). Динамику соотношения Treg/Th17 в ответ на введение вирусных антигенов удалось проследить на примере вакцинации против кори, краснухи и эпидемического паротита. Оказалось, что после введения антигенов быстро повышается количество Th_{act} и Th17 лимфоцитов в периферической крови, и только вслед

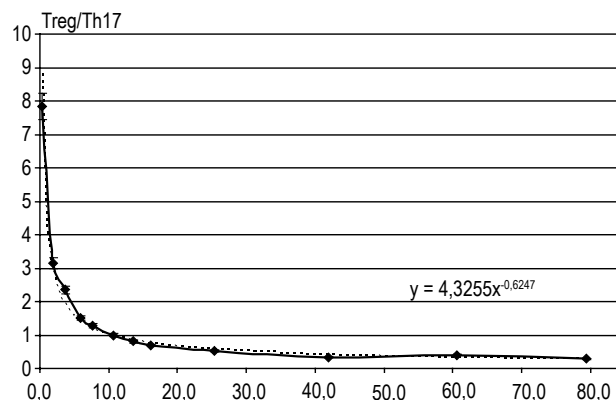


Рисунок 4. Зависимость соотношения Treg/Th17 в периферической крови здоровых людей от возраста ($M \pm SE$)

Примечание. По оси абсцисс – возраст в годах. Пунктирной линией обозначен график аппроксимации, представлена формула графика аппроксимации.

Figure 4. Age dependence of Treg/Th17 lymphocyte subsets ratio in peripheral blood of healthy humans ($M \pm SE$)

Note. Abscissa – number of years. Approximation line is shown by dotted curve.

за этим повышается уровень Treg. По завершении ответа на вакцину уровень Treg возвращается к исходному, тогда как уровень Th17 снижается, но остается чуть выше исходного. Это превышение было не значимым, однако такая тенденция наблюдалась [4]. По-видимому, специфические Th17-лимфоциты образуются при каждом иммунном ответе, и после его завершения какая-то небольшая часть образовавшихся в данном иммунном ответе Th17 превращается в Th17 памяти и сохраняется в организме, чем и объясняется постепенный прирост субпопуляции Th17 с возрастом. В то же время, очевидно, iTreg образуются с некоторой задержкой по времени для завершения иммунного ответа и подавления активированных Th17. Видимо, Treg-клетки памяти тоже постепенно накапливаются, но процесс этот идет менее интенсивно, чем у Th17, поэтому соотношение Treg/Th17 с возрастом постепенно снижается.

Обращают на себя внимание особенности развития иммунной системы в возрасте 10-12 лет. К этому возрасту постепенное снижение абсолютного количества лимфоцитов, $CD3^+$, $CD4^+$ и $CD8^+$ клеток выходит на плато. В этом возрасте происходит перекрест графиков зависимости Treg и Th17 от возраста, как абсолютные количества, так и для процентного соотношения. В этом же возрасте начинает выходить на плато график соотношения Treg/Th17. Более того, известно, что к этому возрасту уровень сывороточных IgA

приближается к взрослой норме [7]. Также завершается созревание IgG2 субкласса, уровень которого в сыворотке крови догоняет взрослую норму к 10-12 годам жизни, тогда как другие IgG-субклассы достигают уровня взрослой нормы существенно раньше [5]. Также хорошо известно, что к этому возрасту в основном заканчиваются частые простудные заболевания, от которых так страдают дети дошкольного и младшего школьного возраста. По-видимому, к 10-12 годам происходит основное становление иммунной системы, а далее достигнутые успехи закрепляются и расширяются. Однако это лишь наблюдения и предположения, требующие отдельного исследования.

Таким образом, в результате проделанной работы удалось показать, что процент Treg в гейте CD3⁺CD4⁺ практически не зависит от возраста обследуемых лиц и аппроксимируется линейной

функцией. В абсолютном выражении уровень Treg в детском возрасте прогрессивно снижается и после 10 лет выходит на плато и аппроксимируется логарифмической кривой. При исследовании возрастной динамики уровня Th17 обнаружен устойчивый рост этой субпопуляции как в процентном, так и в абсолютном выражении. Процент этих клеток от гейта CD3⁺CD4⁺, и абсолютное количество аппроксимируется квадратными уравнениями. Возраст 10-12 лет является, по-видимому, критическим в процессе формирования иммунной системы, к этому возрасту завершаются основные процессы развития различных звеньев иммунитета и дальше происходит их созревание. В старшем возрасте (70 лет и более) выявлено снижение Treg- и Th17-клеток и в абсолютном, и в процентном выражении.

Список литературы / References

1. Борисов А.Г., Савченко А.А., Кудрявцев И.В., Мошев А.В., Козлов В.А. Характеристика субпопуляционного состава Т- и В-лимфоцитов у больных хроническими обструктивными заболеваниями легких при использовании вакцины для профилактики синегнойной инфекции // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 431-442. [Borisov A.G., Savchenko A.A., Kudryavtsev I.V., Moshev A.V., Kozlov V.A. Characteristics of T- and B-cell subpopulation profile in the patients with chronic obstructive pulmonary disease treated with vaccine against *Pseudomonas aeruginosa*. *Meditsinskaya Immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 431-442. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-431-442.
2. Никонова М.Ф., Донецкова А.Д., Сидорович О.И., Лусс Л.В., Ярилин А.А. Особенности экспрессии генов транскрипционных факторов, контролирующих дифференцировку адаптивных субпопуляций CD4⁺-Т-лимфоцитов, при аллергии // Иммунология, 2011. Т. 32, № 4. С. 189-191. [Nikonova M.F., Donetskova A.D., Sidorovich O.I., Luss L.V., Yarilin A.A. Peculiarities of expression of the genes encoding for transcription factors controlling differentiation of adaptive CD4⁺ T-lymphocyte subpopulations in allergy. *Immunologiya = Immunology*, 2011, Vol. 32, no. 4, pp. 189-191. (In Russ.)]
3. Пухальский А.Л., Топтыгина А.П. Сравнительное изучение механизмов антипролиферативного действия низких концентраций мафосфамида и циклоспорина А // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 1993. Т. 115, № 5. С. 514-515. [Pukhalskiy L.A., Toptygina A.P. Comparative study of mechanisms of antiproliferative action of mafosfamide and cyclosporine A in low doses. *Byulleten eksperimental'noy biologii i meditsiny = Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1993, Vol. 115, no. 5, pp. 563-565. (In Russ.)].
4. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Алешкин В.А. Регуляция иммунного ответа у детей, привитых против кори, краснухи и эпидемического паротита // Иммунология, 2012. Т. 33, № 4. С. 175-179. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Alioshkin V.A. Immune response regulation in children vaccinated with measles, rubella and mumps. *Immunologiya = Immunology*, 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 175-179. (In Russ.)]
5. Топтыгина А.П., Семикина Е.Л., Копыльцова Е.А., Алешкин В.А. Возрастные особенности формирования гуморального звена иммунного ответа у детей // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 4-5. С. 289-294. [Toptygina A.P., Semikina E.L., Kopyltsova E.A., Alioshkin V.A. Age related characteristics of humoral immunity maturation in children. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2012, Vol. 14, no. 4-5, pp. 289-294. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2012-4-5-289-294.
6. Хайдуков С.В., Байдун Л.А., Зурочка А.В., Тотолян Арег А. Стандартизованная технология «Исследование субпопуляционного состава лимфоцитов периферической крови с применением проточных цитофлуориметров-анализаторов» (Проект) // Медицинская иммунология, 2012. Т. 14, № 3. С. 255-268. [Khaydukov S.V., Baydun L.A., Zurochka A.V., Totolian Areg A. Standardized technology "Research of lymphocytes subpopulation composition in peripheral blood using flow cytometry analyzers" (Draft). *Meditsinskaya*

immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2012, Vol. 14, no. 3, pp. 255-268. (In Russ.)] doi: 10/15789/1563-0625-2012-3-255-268.

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

8. Abbas A.K., Benoist C., Bluestone J.A., Campbell D.J., Ghosh S., Hori S., Jiang S., Kuchroo V.K., Mathis D., Roncarolo M.G., Rudensky A., Sakaguchi S., Shevach E.M., Vignali D.A., Ziegler S.F. Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature. *Nat. Immunol.*, 2013, Vol. 14, pp. 307-308.

9. Cevenini E., Monti D., Franceschi C. Inflammageing. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 2013, Vol. 16, pp. 14-20.

10. Chougnet C.A., Tripathi P., Lages C.S., Raynor J., Sholl A., Fink P., Plas D.R., Hildeman D.A. A major role for Bim in regulatory T cell homeostasis. *J. Immunol.*, 2011, Vol. 186, pp. 156-163.

11. Cosmi L., Palma R., Santarlasci V., Maggi L., Capone M., Frosali F., Rodolico G., Querci V., Abbate G., Angeli R., Berrino L., Fambrini M., Caproni M., Tonelli F., Lazzeri E., Parronchi P., Liotta F., Maggi E., Romagnani S., Annunziato F. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161⁺CD4⁺ T cell precursor. *J. Exp. Med.*, 2008, Vol. 205, no. 8, pp. 1903-1916.

12. den Braber I., Mugwagwa T., Vrisekoop N., Westera L., Mogling R., de Boer A.B., Willems N., Schrijver E.H., Spierenburg G., Gaiser K., Mui E., Otto S.A., Ruitter A.F., Ackermans M.T., Miedema F., Borghans J.A., de Boer R.J., Tesselaar K. Maintenance of peripheral naive T cells is sustained by thymus output in mice but not humans. *Immunity*, 2012, Vol. 36, no. 2, pp. 288-297.

13. Dong H., Qu S., Chen X., Zhu H., Tai X., Pan J. Changes in the cytokine expression of peripheral Treg and Th17 cells in children with rotavirus enteritis. *Exp. Ther. Med.* 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 679-682.

14. Fontenot J.D., Rasmussen J.P., Williams L.M., Dooley J.L., Farr A.G., Rudensky A.Y. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*, 2005, Vol. 22, pp. 329-341.

15. Gregg R., Smith C.M., Clark F.J., Dunnion D., Khan N., Chakraverty R., Nayak L., Moss P.A. The number of human peripheral blood CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells increases with age. *Clin. Exp. Immunol.* 2005, Vol. 140, pp. 540-546.

16. Grindebacke H., Stenstad H., Quiding-Järbrink M., Waldenström J., Adlerberth I., Wold A.E., Rudin A. Dynamic development of homing receptor expression and memory cell differentiation of infant CD4⁺CD25^{high} regulatory T cells. *J. Immunol.*, 2009, Vol. 183, pp. 4360-4370.

17. Korn T., Bettelli E., Oukka M., Kuchroo V.K. IL-17 and Th17 cells. *Annu. Rev. Immunol.*, 2009, Vol. 27, pp. 485-517.

18. Lages C.S., Suffia I., Velilla P.A., Huang B., Warshaw G., Hildeman D.A., Belkaid Y., Chougnet C. Functional regulatory T cells accumulate in aged hosts and promote chronic infectious disease reactivation. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 181, pp. 1835-1848.

19. Li Y.Y., Wei S.G., Zhao X., Jia Y.Z., Zhang Y.F., Sun S.Z. Th17/Treg cell expression in children with primary nephritic syndrome and the effects of ox-LDL on Th17/Treg cells. *Genet. Mol. Res.*, 2016, Vol. 15, no. 2, pp. 1-8.

20. Li Q., Wang Y., Wang Y., Chen K., Zhou Q., Wei W., Wang Y. Treg/Th17 ratio acts as a novel indicator for acute coronary syndrome. *Cell Biochem. Biophys.*, 2014, Vol. 70, no. 2, pp. 1489-1498.

21. Mosmann T.R., Cherwinski H., Bond M.W., Giedlin M.A., Coffman R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J. Immunol.*, 1986, Vol. 136, pp. 2348-2357.

22. Prelog M., Hillgardt D., Schmidt C.A., Przybylski G.K., Leierer J., Almanzar G., El Hajj N., Lesch K.P., Arolt V., Zwanzger P., Haaf T., Domschke K. Hypermethylation of FOXP3 Promoter and Premature Aging of the Immune System in Female Patients with Panic Disorder? *PLoS One*, 2016, Vol. 11, no. 6, e0157930. doi: 10.1371/journal.pone.0157930.

23. Pukhalsky A.L., Toptygina A.P., Viktorov V.V. Immunosuppressive action of cyclophosphamide in mice: contribution of some factors to determination of strain differences. *Int. J. Immunopharmacol.*, 1993, Vol. 15, no. 4, pp. 509-514.

24. Unutmaz D. RORC2: the master of human Th17 cell programming. *Eur. J. Immunol.*, 2009, Vol. 39, no. 6, pp. 1452-1455.

25. Sakaguchi S., Sakaguchi N., Asano M., Itoh M., Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.*, 1995, Vol. 155, pp. 1151-1164.

26. Seddiki N., Santner-Nanan B., Martinson J., Zaunders J., Sasson S., Landay A., Solomon M., Selby W., Alexander S.I., Nanan R., Kelleher A., Fazekas de St Groth B. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J. Exp. Med.*, 2006, Vol. 203, no. 7, pp. 1693-1700.
27. Schmitt V., Rink L., Uciechowski P. The Th17/Treg balance is disturbed during aging. *Exp. Gerontol.*, 2013, Vol. 48, no. 12, pp. 1379-1386.
28. Sharma S., Dominguez A.L., Lustgarten J. High accumulation of T regulatory cells prevents the activation of immune responses in aged animals. *J. Immunol.*, 2006, Vol. 177, pp. 8348-8355.

Авторы:

Топтыгина А.П. — д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории цитокинов ФБУН «Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Г.Н. Габричевского» Роспотребнадзора; профессор кафедры иммунологии ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия

Семикина Е.Л. — д.м.н., заведующая централизованной клинко-диагностической лабораторией ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ; профессор кафедры факультетской педиатрии № 1 ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Петричук С.В. — д.б.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Закиров Р.Ш. — врач централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Курбатова О.В. — научный сотрудник лаборатории экспериментальной иммунологии и вирусологии ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Копыльцова Е.А. — к.м.н., старший научный сотрудник централизованной клинко-диагностической лаборатории ФГАУ «Научный центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Комах Ю.А. — д.м.н., руководитель лаборатории трансплантологии и клеточной биологии ФГАУ «Межотраслевой научно-технический комплекс „Микрохирургия глаза“ им. академика С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Toptygina A.P., PhD, MD (Medicine), Leading Research Associate, Laboratory of Cytokines, G.N. Gabrichevsky Research Institute for Epidemiology and Microbiology; Professor, Chair of Immunology, Faculty of Biology, M. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Semikina E.L., PhD, MD (Medicine), Head, Centralized Laboratory for Clinical Diagnostics, Research Center of Children's Health; Professor, Chair of Faculty Pediatrics № 1, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow Russian Federation

Petrichuk S.V., PhD, MD (Biology), Professor, Main Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Zakirov R.Sh., Clinical Pathologist, Centralized Diagnostic Laboratory, Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Kurbatova O.V., Research Associate, Laboratory of Experimental Immunology and Virology, Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Kopyltsova E.A., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Centralized Diagnostic Laboratory, Research Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Komakh Yu.A., PhD, MD (Medicine), Head, Transplantology and Cellular Biology Laboratory, The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

УЧАСТИЕ ПЕРФОРИН/ГРАНЗИМ Б-ЗАВИСИМОГО МЕХАНИЗМА В РЕАЛИЗАЦИИ ЦИТОТОКСИЧЕСКОГО ЭФФЕКТА ДЕНДРИТНЫХ КЛЕТОК ПРОТИВ КЛЕТОК ГЛИОБЛАСТОМЫ ЧЕЛОВЕКА

Тыринова Т.В.¹, Леплина О.Ю.¹, Мишинов С.В.², Тихонова М.А.¹,
Калиновский А.В.³, Чернов С.В.³, Ступак В.В.², Останин А.А.¹,
Черных Е.Р.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии»,
г. Новосибирск, Россия

² ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна»
Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

³ ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Грануло-опосредованная цитотоксичность для клеток-эффекторов является универсальным механизмом подавления опухолевого роста и индукции гибели клеток-мишеней. Целью работы явилось изучение экспрессии цитолитических молекул дендритными клетками (ДК), генерированными в присутствии IFN α (IFN-ДК), а также исследование роли грануло-опосредованного механизма в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против опухолевых клеточных линий. IFN-ДК генерировали путем культивирования прилипающей фракции МНК в присутствии GM-CSF и IFN α в течение 4 суток с последующим созреванием с ЛПС в течение 24 ч. Опухолевые линии были получены из фрагментов опухоли пациентов с внутримозговой глиобластомой. Индукция созревания IFN-ДК под действием ЛПС ассоциировалась с накоплением внутриклеточного пула молекул перфорины и гранзима Б. Экспрессия перфорины в ЛПС-стимулированных IFN-ДК прямо коррелировала с внутриклеточной экспрессией лизосомально-ассоциированного мембранного белка-1 (LAMP-1/CD107a), при этом уровень последнего не менялся в ответ на стимуляцию ЛПС. В то же время ЛПС стимулировал дегрануляцию в IFN-ДК, о чем свидетельствовало увеличение доли клеток, экспрессирующих CD107a на поверхностной мембране ДК. Активация ЛПС генерированных из моноцитов крови тех же доноров ДК по стандартному протоколу (в присутствии GM-CSF и IL-4 [IL-4-ДК]) не влияла на уровень экспрессии перфорины и гранзима Б в IL-4-ДК, которая была значимо ниже по сравнению с аналогичными культурами IFN-ДК. В ответ на стимуляцию ЛПС отмечалось увеличение внутриклеточного пула CD107a в IL-4-ДК при отсутствии изменений в поверхностной экспрессии CD107a. Исследование цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК против глиобластомных клеточных линий показало вовлеченность перфорин/гранзим Б-сигнального пути в реализацию цитотоксической активности ДК, поскольку блокирование этого механизма с помощью ингибитора вакуолярной H⁺-АТФ-азы конканамицина А (СМА) ослабляло цитотоксическую

Адрес для переписки:

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

Address for correspondence:

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

Образец цитирования:

Т.В. Тыринова, О.Ю. Леплина, С.В. Мишинов,
М.А. Тихонова, А.В. Калиновский, С.В. Чернов,
В.В. Ступак, А.А. Останин, Е.Р. Черных «Участие
перфорин/гранзим Б-зависимого механизма
в реализации цитотоксического эффекта дендритных
клеток против клеток глиобластомы человека»
// Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4.
С. 421–430. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-421-430

© Тыринова Т.В. и соавт., 2017

For citation:

T.V. Tyrinova, O.Yu. Leplina, S.V. Mishinov, M.A. Tikhonova,
A.V. Kalinovskiy, S.V. Chernov, V.V. Stupak, A.A. Ostanin,
E.R. Chernykh "Involvement of perforin/granzyme B-dependent
signaling pathway in cytotoxic activity of dendritic cells towards
human glioblastoma cells", Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 421–430.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-421-430

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-421-430

активность IFN-ДК. При этом различная выраженность подавления цитотоксичности ДК с помощью СМА свидетельствовала о существовании перфорин/гранзим Б-независимых механизмах цитотоксического действия IFN-ДК против глиобластомных клеток.

Ключевые слова: дендритные клетки, интерферон-альфа, перфорин, гранзим Б, CD107a, глиобластома

INVOLVEMENT OF PERFORIN/GRANZYME B-DEPENDENT SIGNALING PATHWAY IN CYTOTOXIC ACTIVITY OF DENDRITIC CELLS TOWARDS HUMAN GLIOBLASTOMA CELLS

Tyrinova T.V.^a, Leplina O.Yu.^a, Mishinov S.V.^b, Tikhonova M.A.^a,
Kalinovskiy A.V.^c, Chernov S.V.^c, Stupak V.V.^b, Ostanin A.A.^a,
Chernykh E.R.^a

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

^b Ya.L. Tsivyan Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

^c Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Abstract. Granule-mediated cytotoxicity of effector cells is a universal mechanism of tumor growth inhibition and induction of tumor cell death. The aim of present study was to evaluate expression of lytic molecules in DCs generated in presence of IFN α (IFN-DCs), and to analyze the role of granule-mediated mechanism for IFN-DC cytotoxic activity against tumor cell lines. IFN-DCs were generated by culturing of plastic-adherent peripheral blood mononuclear cells in presence of GM-CSF and IFN α for 4 d followed by LPS addition for 24 h. The tumor cell lines were obtained from malignant tissues from patients with glioblastoma multiforme. Maturation of IFN-DCs in presence of LPS was accompanied by accumulation of intracellular perforin and granzyme B molecules. Perforin expression showed a direct correlation with intracellular lysosome-associated membrane protein-1 (LAMP-1/CD107a) expression in LPS-stimulated IFN-DCs. However, CD107a expression did not increase under LPS stimulation. At the same time, LPS caused upregulated degranulation in IFN-DCs, as shown by an increase of surface CD107a expression on IFN-DCs. LPS activation of DCs generated from the same donors in the presence of GM-CSF and IL-4 (IL-4-DCs) did not influence perforin and granzyme B expression in IL-4-DCs which was significantly lower than in IFN-DCs. Intracellular pool of CD107a molecules was increased in response to LPS stimulation of IL-4-DCs, but surface CD107a expression did not change on IL-4-DCs. Studies of cytotoxic activity of LPS-stimulated IFN-DCs revealed that concanamycin A (CMA), an inhibitor of vacuolar H⁺-ATPase and of perforin/granzyme B-mediated signaling pathway, caused reduced cytotoxicity of donor DCs towards glioblastoma cell lines. Involvement of perforin/granzyme B-signaling pathway into the DCs cytotoxicity was confirmed with glioblastoma cell lines, since blockage of this mechanism with vacuolar H⁺ ATPase blocker (CMA) caused inhibition of the IFN-DC cytotoxicity. Differently reduced DC cytotoxic activity by CMA may suggest that the glioblastoma cell lysis can be mediated via perforin/granzyme B-independent mechanisms.

Keywords: dendritic cells, interferon-alpha, perforin, granzyme B, CD107a, glioblastoma multiforme

Введение

Дендритные клетки (ДК) являются высоко-специализированными антигенпрезентирующими клетками, обеспечивающими запуск иммунного ответа против различных, в том числе опухолевых, антигенов [4]. Наряду с запуском адаптивного иммунного ответа ДК обладают эффекторной функцией и способны подавлять рост и пролиферацию опухолевых клеток за счет прямого цитотоксического действия [14, 26].

Известно, что противоопухолевый эффект цитотоксических клеток (НК-клеток, цитотоксических CD8⁺T-лимфоцитов) реализуется с вовлечением рецептор- и грануло-зависимого механизмов. Первый опосредуется за счет вза-

имодействия мембранно-связанных и растворимых проапоптогенных молекул (TNF α , FasL, TRAIL и др.), экспрессируемых цитотоксическими клетками, с соответствующими рецепторами на опухолевых клетках. Второй (перфорин/гранзим-зависимый путь) связан с дегрануляцией и высвобождением в иммунологический синапс содержащихся в литических гранулах цитолитических медиаторов, включая перфорин, обеспечивающий формирование пор в клетках-мишенях, и гранзим Б, проникающий через поры и индуцирующий процессы апоптоза [11].

Согласно данным литературы, индукторами цитотоксической активности ДК являются интерфероны I типа (IFN-I) [12, 19]. Проведенные нами ранее исследования показали, что ДК, ге-

нерируемые из моноцитов крови в присутствии GM-CSF и IFN α (IFN-ДК), способны лизировать различные типы опухолевых клеток за счет TNF α -, FasL-, а также TRAIL-опосредованных сигнальных путей. При этом цитотоксичность IFN-ДК против FasL- и TRAIL-чувствительных опухолевых клеток даже превышает цитотоксическую активность ДК, генерируемых стандартно в присутствии GM-CSF и IL-4 (IL-4-ДК) [25]. Также нами было показано, что IFN-ДК обладают способностью лизировать клетки первичных опухолевых линий, полученных от пациентов с глиобластомой [25]. Однако, вопрос об экспрессии IFN-ДК перфорина и гранзима Б и участии этих медиаторов в реализации цитотоксической активности IFN-ДК, в том числе против глиобластомных клеток, остается практически неисследованным.

В связи с этим **целью настоящей работы** явилось изучение экспрессии основных компонентов литических гранул IFN-ДК с учетом степени зрелости ДК, а также исследование роли гранулопосредованного сигнального пути в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против клеточных линий, полученных из фрагментов опухоли пациентов с внутримозговой глиобластомой.

Материалы и методы

В исследование были включены 25 здоровых доноров крови. Забор крови и все иммунологические исследования проводили после получения письменного информированного согласия. Мононуклеарные клетки (МНК) выделяли центрифугированием гепаринизированной венозной крови в градиенте плотности фиколла-верографина. IFN-ДК получали путем культивирования прилипающей фракции МНК в 6-луночных планшетах (Nunc, Дания) в течение 4 суток в среде RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, США), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 100 мкг/мл гентамицина и 2,5% FBS (BioWest, США) в присутствии GM-CSF (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) и IFN α (1000 Ед/мл, Роферон-А, Roche, Швейцария) с последующим дозреванием в течение 24 ч с липополисахаридом (ЛПС, 10 мкг/мл, LPS *E.coli* 0114:B4, Sigma-Aldrich). Для генерации IL-4-ДК прилипающую фракцию МНК инкубировали в полной культуральной среде в присутствии GM-CSF (40 нг/мл) и IL-4 (40 нг/мл, Sigma-Aldrich) в течение 5 суток. Конечное созревание IL-4-ДК индуцировали путем дополнительного культивирования клеток в течение 48 ч в присутствии ЛПС (10 мкг/мл). В серии экспериментов в качестве контроля IFN-ДК и IL-4-ДК культивировали 5 суток и 7 суток соответственно, без добавления ЛПС (интактные ДК).

Фенотипический анализ ДК проводили методом проточной цитофлуориметрии (FACS Calibur, Becton Dickinson, США) в гейте HLA-DR⁺ кле-

ток с использованием FITC-, PE- или APC-меченных моноклональных анти-HLA-DR, -CD107a, -гранзим Б, -перфорин антител (BD PharMingen, США). Для оценки внутриклеточной экспрессии CD107a, гранзима Б и перфорина ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Далее ДК инкубировали с PE- или APC-конъюгированными анти-CD107a-, анти-гранзим Б- или анти-перфорин-антителами, используя коммерческий набор для определения внутриклеточных молекул фирмы BD Biosciences (BDTM Pharmingen Transcription Factor Buffer Set).

Оценку экспрессии CD107a на поверхности ДК проводили путем добавления моноклональных анти-CD107a антител (BD PharMingen, США) в культуры IFN-ДК на 4 суток (без ЛПС или совместно с ЛПС) и в культуры IL-4-ДК на 6 суток культивирования. По окончании культивирования ДК инкубировали с FITC-конъюгированными анти-HLA-DR-антителами согласно стандартной методике для определения поверхностных антигенов. Уровень экспрессии CD107a оценивали в гейте HLA-DR⁺ клеток.

Первичные культуры глиобластомных клеток были получены путем механической и последующей ферментативной (0,3% коллагеназы-I, Sigma-Aldrich) дезагрегации фрагмента ткани опухоли, полученной хирургическим путем от 4 пациентов с гистологически верифицированной глиобластомой (Grade IV), проходивших обследование и лечение в отделении нейрохирургии Новосибирского НИИТО и Федеральном нейрохирургическом центре. Исследования проводили после получения письменного информированного согласия больных.

Полученную суспензию глиобластомных клеток культивировали при 37 °C и 5%CO₂ в среде DMEM (Gibco, UK), дополненной 0,3 мг/мл L-глутамина, 5 мМ HEPES-буфера, 10⁻⁴М меркаптэтанол, 100 мкг/мл гентамицина и 10% FBS, обновляя питательную среду два раза в неделю. Пассирование клеток осуществляли при достижении субконфлюэнтного роста адгезивных клеток посредством 0,25% трипсина (Sigma-Aldrich) и 0,02% ЭДТА (ICN, USA).

Цитотоксическую активность ДК оценивали против полученных глиобластомных клеточных линий с помощью МТТ-теста в течение 24 ч в соотношении эффектор:мишень 1:1. В отдельной серии экспериментов ДК доноров предварительно инкубировали в течение 2 ч с конканамицином А (100 нМ, Santa Cruz Biotechnology, США).

Уровень цитотоксической активности определяли по формуле:

$$(\%) = [1 - (\text{ОПЭ} + \text{м} - \text{ОПЭ}) / \text{ОПМ}] \times 100\%,$$

где ОПЭ+м – оптическая плотность в опытных образцах; ОПЭ – оптическая плотность в лунках

с эффекторами; ОПм — оптическая плотность в лунках с мишенями. Оптическую плотность измеряли при длине волны 492 нм на многоканальном спектрофотометре (Thermo Scientific Multiskan FC, Finland).

Статистическую обработку данных проводили при помощи пакета прикладных программ Statistica 6.0 для Windows. Данные представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного диапазона (IQR). Для выявления значимых различий сравниваемых показателей использовали непараметрический U-критерий Вилкоксона—Манна. Для анализа взаимосвязей между исследуемыми параметрами использовали коэффициент корреляции Спирмена. Различия считали достоверными при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты

Фенотипический анализ показал, что среди незрелых IFN-ДК в среднем 12 и 14,8% клеток внутриклеточно экспрессируют перфорин и гранзим Б соответственно (рис. 1). Сходный уровень внутриклеточной экспрессии перфорина и гранзима Б регистрировался и в популяции незрелых IL-4-ДК (Me 11,5 и 18,2% соответственно). Конечное дозревание IFN-ДК в присутствии ЛПС сопровождалось двукратным увеличением количества перфорин⁺ и гранзим-Б⁺ клеток ($p_U = 0,028$). В то же время среди зрелых, ЛПС-стимулированных IL-4-ДК содержание клеток, экспрессирующих перфорин и гранзим

Б, значимо не менялось (рис. 1 и 2). В результате в условиях активации ЛПС IFN-ДК отличались от IL-4-ДК достоверно более высокой внутриклеточной экспрессией перфорина (Me 24,5 vs 17%, $p = 0,028$) и гранзима Б (Me 27,8 vs 20,2%, $p = 0,046$). Таким образом, индукция созревания ДК под действием ЛПС ассоциировалась с накоплением перфорина и гранзима Б в популяции IFN-ДК, но не влияла на уровень внутриклеточной экспрессии анализируемых молекул в IL-4-ДК.

Важно отметить, что неперенным условием для реализации киллерной активности эффекторных клеток через перфорин/гранзим Б-зависимый механизм является дегрануляция, т.е. процесс слияния мембраны литических гранул с поверхностной мембраной клетки. Одним из белков мембраны гранул является лизосомально-ассоциированный мембранный белок — 1 (LAMP-1, CD107a), который в процессе дегрануляции обнаруживается на поверхности клеток-эффекторов и, соответственно, может выступать в качестве маркера цитотоксической функции этих клеток [1]. Поэтому, наряду с анализом перфорина и гранзима Б в ДК, была также исследована экспрессия CD107a. Учитывая, что процессы дегрануляции могут индуцироваться активационными стимулами, экспрессия CD107a на ДК оценивалась до и после активации ЛПС.

Как видно из рисунка 3, относительное количество интактных IFN-ДК, внутриклеточно

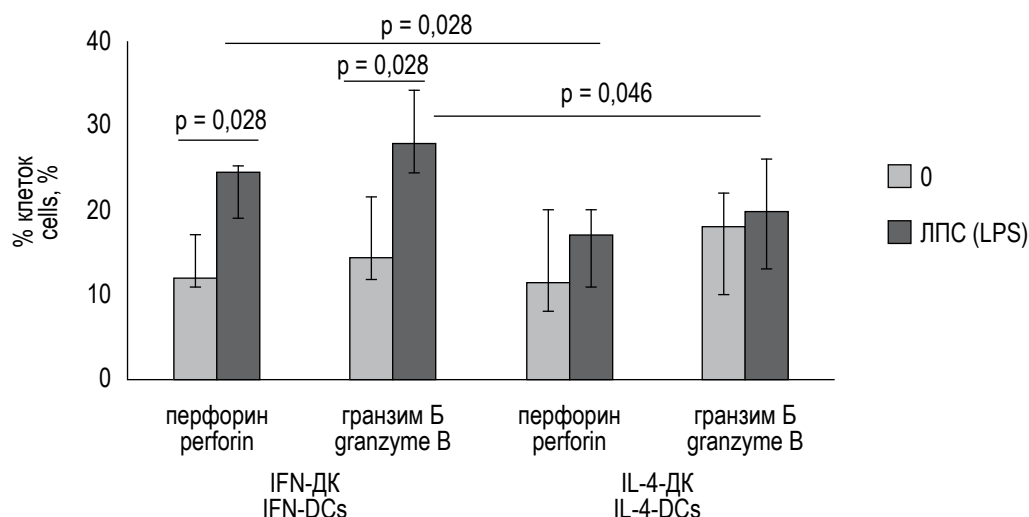


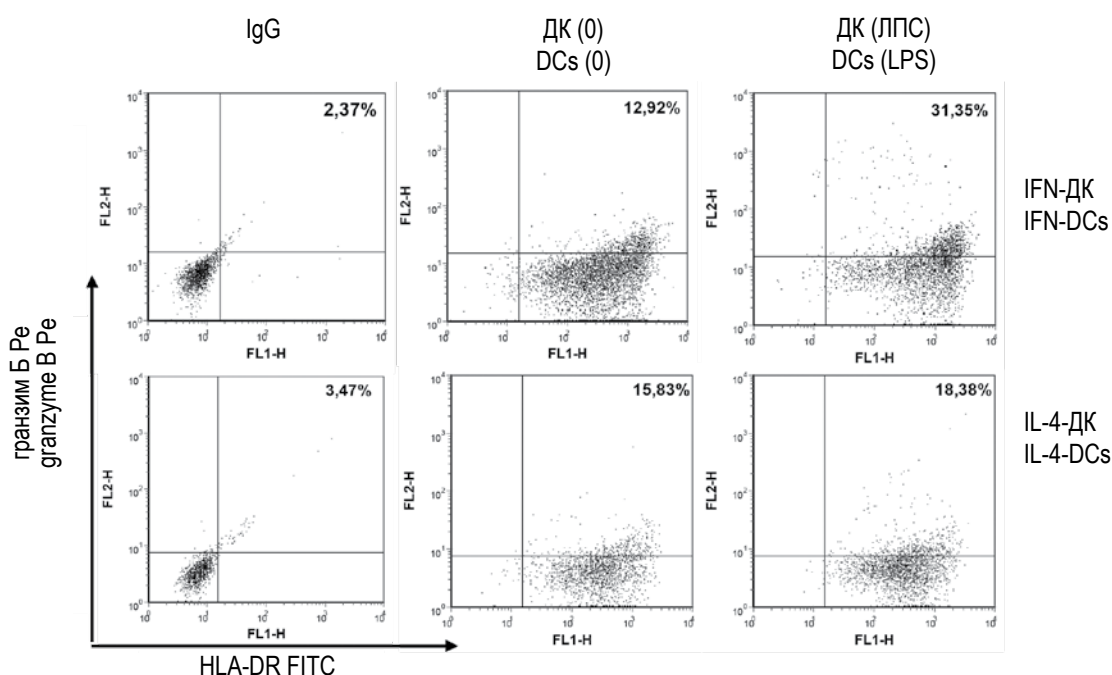
Рисунок 1. Внутриклеточная экспрессия перфорина и гранзима Б дендритными клетками здоровых доноров

Примечание. Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) внутриклеточной экспрессии перфорина и гранзима Б в гейте HLA-DR⁺ клеток среди интактных (0) и ЛПС-стимулированных (ЛПС) IFN-ДК (n = 6) и IL-4-ДК (n = 6) здоровых доноров. P — U-критерий Манна-Уитни.

Figure 1. Intracellular perforin and granzyme B expression in healthy donor's DCs

Note. Data of intracellular perforin and granzyme B expression detected in HLA-DR⁺ gate for IFN-DCs and IL-4-DCs from healthy donors, either intact (0), or LPS-stimulated cells (LPS) (n = 6). The data are presented as mediane (Me) and interquartile range (IQR). P, confidence level by Mann-Whitney U-test.

A (A)



Б (B)

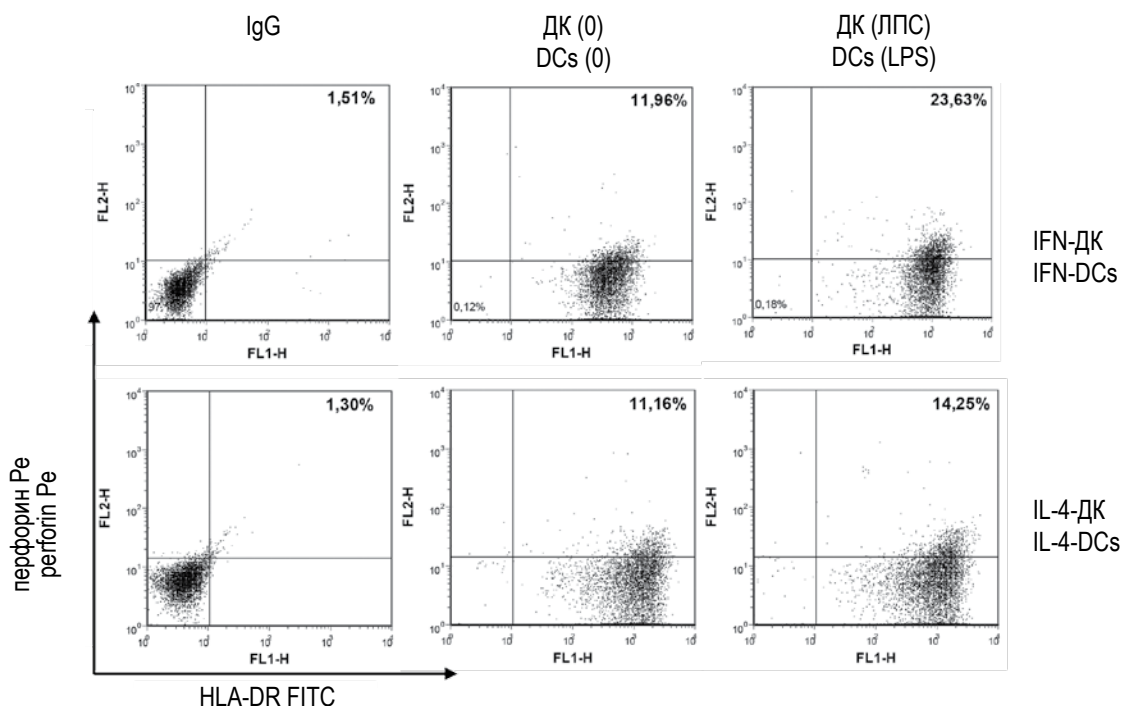


Рисунок 2. Экспрессии молекул перфорина и гранзима Б интактными и ЛПС-стимулированными дендритными клетками

Примечание. Представлены индивидуальные гистограммы распределения IFN-ДК и IL-4-ДК по флуоресценции FITC-меченых анти-HLA-DR и Ре-меченных анти-гранзим Б или анти-перфорин антител в популяции интактных (ДК 0) и ЛПС-стимулированных (ДК ЛПС) клеток. Контроль (IgG) – ДК, меченные соответствующими изотип-специфическими антителами. Относительное содержание HLA-DR⁺гранзим Б⁺ ДК и HLA-DR⁺ перфорин⁺ ДК – правый верхний квадрант.

Figure 2. Perforin and granzyme B expression in intact (DC 0) and LPS-stimulated (DC LPS) DCs

Note. Representative flow cytometric dot plots are showing expression of HLA-DR (FITC-conjugated monoclonal antibody) and granzyme B or perforin (Pe-conjugated monoclonal antibodies) in intact (DC 0) and LPS-stimulated (DC LPS) IFN-DCs or IL-4-DCs. Control (IgG) represents DCs labeled with appropriate isotype-specific monoclonal antibodies. HLA-DR/granzyme B, or HLA-DR/perforin-double staining cells are seen in upper right quadrant.

экспрессирующих CD107a, составляло в среднем 47,5%. В ответ на стимуляцию ЛПС этот показатель значимо не менялся (Me 51%). Тем не менее, в популяции ЛПС-стимулированных IFN-ДК обнаруживалась сильная корреляционная взаимосвязь между внутриклеточной экспрессией перфорина и CD107a ($R = 0,899$; $p = 0,015$).

Незрелые интактные IL-4-ДК экспрессировали схожий уровень внутриклеточной формы CD107a (Me 55%), при этом в ответ на стимуляцию ЛПС количество CD107a-позитивных IL-4-ДК возрастало до 79% ($p = 0,028$). Однако в отличие от IFN-ДК в популяции ЛПС-стимулированных IL-4-ДК значимой взаимосвязи между внутриклеточной экспрессией исследуемых молекул (CD107a, перфорин, гранзим Б) выявлено не было.

Анализ поверхностной экспрессии CD107a показал, что в среднем 27% интактных IFN-ДК несут на мембране молекулу CD107a. При активации ЛПС наблюдалось недостоверное увеличение количества повCD107a⁺ клеток (до 38%, $p = 0,17$). В популяции незрелых интактных IL-4-ДК относительное содержание повCD107a⁺ клеток было достоверно меньше (15%, $p = 0,043$). В ответ на дозревающий сигнал (ЛПС) их количество оставалось на таком же уровне, что было практически в 3 раза ниже, чем в популяции ЛПС-стимулированных IFN-ДК (13 vs 38%, $p = 0,043$).

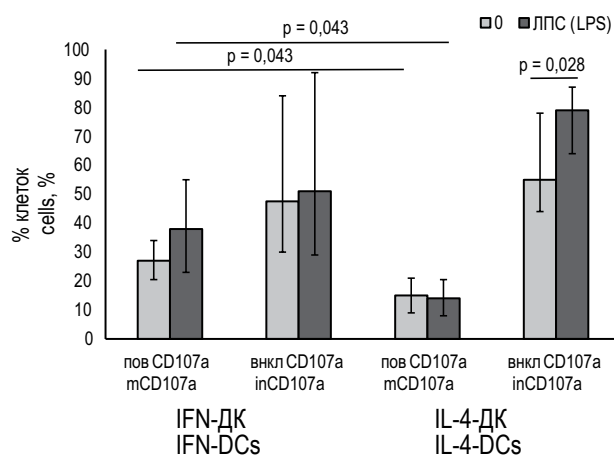


Рисунок 3. Экспрессия CD107a дендритными клетками здоровых доноров

Примечание. Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) поверхностной (повCD107a) и внутриклеточной (внклCD107a) экспрессии CD107a в гейте HLA-DR⁺ клеток среди интактных (0) и ЛПС-стимулированных (ЛПС) IFN-ДК ($n = 6$) и IL-4-ДК ($n = 5$) здоровых доноров. P – U-критерий Манна-Уитни.

Figure 3. CD107a expression in DCs from healthy donors
Note. Data on surface (mCD107a) and intracellular (inCD107a) CD107a expression detected in HLA-DR⁺ gate. Intact healthy donor cells (0) and LPS-stimulated (LPS) IFN-DCs ($n = 6$), or IL-4-DCs ($n = 5$) are presented as median (Me) and interquartile range (IQR). P, confidence levels by Mann-Whitney U-test.

Таким образом активация ЛПС индуцирует в популяции IFN-ДК как усиление экспрессии перфорина и гранзима Б, так и дегрануляцию литических гранул. В то же время в популяции IL-4-ДК активация ЛПС приводит к увеличению внутриклеточного пула CD107a, которое не сопровождается значимым возрастанием внутриклеточного уровня перфорина/гранзима Б и усилением экспрессии мембранной формы CD107a.

Следующий этап исследования был посвящен изучению участия перфорин/гранзим Б-зависимого механизма в реализации цитотоксической активности ЛПС-стимулированных IFN-ДК против глиобластомных клеток. Цитотоксичность ДК оценивали против четырех клеточных линий, которые были получены из фрагментов опухоли больных глиобластомой (Grade IV). Как видно из рисунка 4, IFN-ДК доноров эффективно лизировали клетки всех 4-х опухолевых линий. Медиана цитотоксичности IFN-ДК варьировала от 36% до 70% в зависимости от клеточной линии. Для блокирования перфорин/гранзим Б-зависимого цитолиза ДК предварительно обрабатывали конканамицином А (СМА). СМА является специфическим ингибитором вакуолярной H⁺-АТФ-азы, что способствует нейтрализации pH в литических гранулах и приводит в конечном итоге к инактивации молекул перфорина [16].

В целом по группе ($n = 19$) противоопухолевая цитотоксическая активность IFN-ДК доноров ($n = 5$) против клеток глиобластомных линий ($n = 4$) после обработки СМА снижалась в среднем с 47 до 34%, $p_U = 0,07$ (рис. 5). Выраженность ингибирующего эффекта СМА прямо коррелировала с исходным уровнем цитотоксичности IFN-ДК ($R = 0,50$; $p = 0,027$; $n = 19$). Так, при исходно высокой цитотоксической активности ДК ($\geq 47\%$, $n = 10$) конканамицин А оказывал наиболее выраженный эффект, что проявлялось 2-кратным снижением киллерной функции IFN-ДК с 60 до 27%, $p = 0,006$. В то же время СМА не оказывал ингибирующего действия на ДК с относительно низким ($< 47\%$, $n = 9$) уровнем цитотоксичности. Таким образом, способность IFN-ДК доноров эффективно лизировать клетки глиобластомы опосредуется с вовлечением перфорин/гранзим Б-зависимого пути. С другой стороны, подавление высокой цитотоксической активности ДК только на 50%, а также отсутствие эффекта СМА в культурах ДК с исходно низкой цитотоксичностью свидетельствует о существовании перфорин/гранзим Б-независимых механизмов цитотоксического действия IFN-ДК против глиобластомных клеток.

Обсуждение

Эффекторная функция ДК, как и других клеток врожденного иммунитета, связана с цитотоксическим действием на клетки-мишени. Не-

смотря на различия в путях активации, способах распознавания клеток-мишеней, клетки-эффекторы медируют схожие апоптоз-индуцирующие сигнальные пути. Грануло-опосредованная цитотоксичность для клеток-эффекторов является универсальным механизмом подавления опухолевого роста и индукции гибели клеток-мишеней. При этом показано, что, наряду с NK-клетками и CD8⁺ T-лимфоцитами, различные типы ДК могут также вызывать перфорин/гранзим Б-зависимый цитолитический эффект опухолевых клеток. Экспрессия перфорина и гранзима Б продемонстрирована как для плазматических [13, 15], так и миелоидных ДК [24]. Также экспрессия перфорина и гранзима Б характерна для ДК, генерируемых из моноцитов в присутствии IFN α , IL-4 или IL-15 [3, 17].

Как известно, IFN α является одним из мощных стимуляторов киллерной активности эффекторных клеток, в том числе и ДК [12, 22, 25]. В настоящей работе показано, что часть IFN-ДК здоровых доноров также экспрессируют перфорин и гранзим Б. Причем при схожем уровне экспрессии этих молекул в интактных IFN-ДК и IL-4-ДК после активации ЛПС IFN-ДК характеризовались достоверно более высокой внутриклеточной экспрессией перфорина и гранзима Б по сравнению с IL-4-ДК. По-видимому, обнаруженные различия между двумя этими популяциями ДК связаны с разным уровнем синергичной активации экспрессии генов перфорина и гранзима Б в ответ на стимуляцию ЛПС и IFN α или IL-4 соответственно. В пользу этого предположения свидетельствуют данные ряда авторов об оппозитном эффекте IL-4 и IFN α на экспрессию перфорина и гранзима Б. Так, IL-4 является негативным регулятором экспрессии генов гранзима Б и перфорина в IL2-активированных NK-клетках [10]. Кроме того, IL-4 дозозависимо подавляет экспрессию и продукцию гранзима Б в регуляторных Т-клетках (Treg), а также гранзим Б-опосредованную противоопухолевую цитотоксичность Treg [9]. В отношении IFN α , наоборот, показано стимулирующее влияние на экспрессию гранзима Б на уровне гена и самого белка в NK-клетках и их цитотоксическую активность [27], а также на экспрессию мРНК перфорина [20].

Еще одним маркером грануло-опосредованной цитотоксичности клеток является молекула CD107a, относящаяся к группе лизосомально-ассоциированных мембранных белков (LAMP) [1]. Согласно полученным нами данным, стимуляция ЛПС не влияла на внутриклеточную экспрессию CD107a в IFN-ДК. Поскольку CD107a находится на мембране цитолитических гранул, можно предположить, что накопление пула перфорина и гранзима Б в ответ на стимуляцию ЛПС происходило в ранее сформированные CD107a-позитивные гранулы. Интересно отметить, что

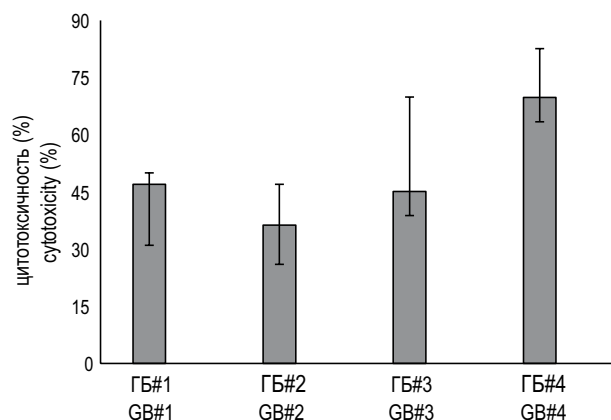


Рисунок 4. Цитотоксическая активность IFN-ДК доноров против глиобластомных клеточных линий

Примечание. Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) цитотоксической активности (%) ЛПС-стимулированных IFN-ДК здоровых доноров (n = 5) против опухолевых клеточных линий, полученных из фрагментов опухоли четырех пациентов с глиобластомой (Grade IV). Цитотоксическую активность оценивали с помощью МТТ-теста при соотношении эффекторы : мишени – 1:1.

Figure 4. Cytotoxic activity of donor IFN-DCs against glioblastoma cell lines

Note. Data of cytotoxic activity of LPS-stimulated (n = 5) IFN-DCs from healthy donors against tumor cell lines obtained from malignant tissues of four patients with glioblastoma multiforme (Grade IV). The results are presented as median (Me) and interquartile range (IQR). Cytotoxic activity was determined using MTT-assay, at a ratio of effector cells (DCs)-to-targets (tumor cells) as 1:1.

в культурах IL-4-ДК стимуляция интактных ДК сопровождалась приростом CD107a в цитоплазме клеток на фоне практически неменяющейся экспрессии перфорина и гранзима Б. Эти данные могут косвенно указывать на менее эффективную способность IL-4-ДК лизировать клетки-мишени через грануло-опосредованный механизм цитотоксичности.

Полученные нами данные показали, что уровень внутриклеточной экспрессии CD107a в ЛПС-стимулированных IFN-ДК прямо коррелировал с перфорином, но не гранзимом Б. Выявленный факт согласуется с результатами исследования роли CD107a в перфорин/гранзим Б-опосредованной цитотоксичности NK-клеток [18]. Так, показано, что для CD107a-дефицитных мышей характерны нарушения трафика перфорина (но не гранзима Б) в литические гранулы и низкий уровень экспрессии зрелых форм перфорина. Результатом таких нарушений является дефект цитотоксической функции NK-клеток, поскольку низкое количество перфорина, высвобождающегося в процессе деградации в иммунологический синапс, не обеспечивает эффективного проникновения гранзима Б в клетки-мишени.

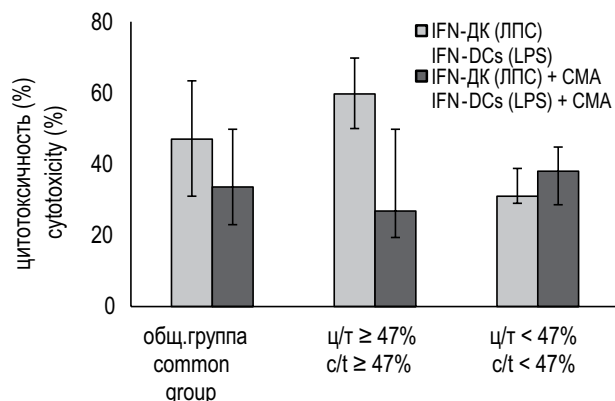


Рисунок 5. Влияние конканамицина А на цитотоксическую активность IFN-ДК доноров против клеток глиобластомы

Примечание. Представлены медианные значения (Me) и интерквартильный диапазон (IQR) цитотоксической активности (%) ЛПС-стимулированных интактных и СМА-обработанных (IFN-ДК(ЛПС) и IFN-ДК(ЛПС) + СМА) ДК здоровых доноров против опухолевых клеточных линий пациентов с глиобластомой (Grade IV, n = 4). Данные представлены в общей группе (n = 19), а также в подгруппах с высокой (ц/т ≥ 47%, n = 10) и низкой (ц/т < 47%, n = 9) цитотоксической активностью IFN-ДК.

Figure 5. The effect of concanamycin A on cytotoxic activity of donor IFN-DCs against glioblastoma cell lines

Note. The data are presented as median (Me) and interquartile range (IQR) of cytotoxic activity produced by LPS-stimulated, CMA-free, or CMA-treated [IFN-DC(LPS) and IFN-DC(LPS) + CMA] DCs from healthy donors against tumor cell lines of glioblastoma patients (Grade IV, n = 4). Data are presented for the total group (n = 19), and in subgroups with high (c/t ≥ 47%, n = 10) and low (c/t < 47%, n = 9) cytotoxicity.

Процесс дегрануляции сопровождается экстернализацией CD107a на поверхности различных цитотоксических клеток (CTL, NK, нейтрофилы, макрофаги) и является маркером цитотоксической функции NK-клеток и CD8⁺T-лимфоцитов [1, 2]. Согласно полученным нами данным, молекула CD107a определялась на поверхности IFN-ДК. При этом активация ЛПС усиливала дегрануляцию IFN-ДК, о чем свидетельствовало увеличение количества IFN-ДК, экспрессирующих на поверхности CD107a. В то же время в культурах IL-4-ДК активация ЛПС, ведущая к увеличению внутриклеточного пула CD107a, не сопровождалась экстернализацией данной молекулы. Полученные данные позволяют предполагать, что, по аналогии с NK-клетками и CD8⁺T-лимфоцитами, анализ поверхностной экспрессии CD107a может быть использован в качестве маркера противоопухолевой цитотоксической функции и дегрануляции IFN-ДК в ответ на стимуляцию опухолевыми антигенами. Однако это предположение требует дальнейшего изучения.

Способность ДК проявлять киллерную активность против перфорин/гранзим

Б-чувствительной опухолевой линии K562 является известным фактом [3, 17, 24]. Нами впервые изучено участие перфорин/гранзим Б-зависимого механизма в реализации цитотоксической активности IFN-ДК против клеточных линий, полученных непосредственно из ткани опухоли больных с глиобластомой. Ранее нами было показано, что IFN-ДК здоровых доноров эффективно лизируют первичные глиобластомные культуры [25]. Однако вопрос о вовлечении перфорин/гранзим Б-зависимого пути в этом случае оставался открытым. Между тем, гранулоопосредованная цитотоксичность может иметь большое значение в противоопухолевом иммунитете при глиальных опухолях головного мозга, поскольку многие глиомные опухолевые линии резистентны к рецептор-опосредованному апоптозу [6, 8]. В литературе имеются отдельные сообщения о чувствительности клеток глиобластомы к перфорин/гранзим Б-опосредованному лизису [11, 21]. Исследования *in situ* показали, что в области иммунологического синапса между глиобластомными клетками человека и опухоль-инфильтрирующими CD8⁺T-лимфоцитами обнаруживается гранзим Б [5]. При этом в самих опухолевых клетках этой зоны наблюдаются нарушения полимеризации микротубулярной системы цитоскелета и высокий уровень экспрессии активной формы каспазы-3, что может свидетельствовать о чувствительности глиобластомных клеток к гранзим Б-опосредованному цитолизу. Исследования Renner и соавт. показали, что в экспериментальных моделях перфорин опосредует не только прямое цитотоксическое действие CD8⁺T-клеток, но также способствует нарушению сосудистой проницаемости в зоне опухоли [23].

Проведенное нами исследование прямо демонстрирует, что перфорин/гранзим Б-сигнальный путь вовлечен в реализацию цитотоксической активности IFN-ДК против глиобластомных клеток, и блокирование этого механизма с помощью СМА значительно ослабляет цитотоксическую активность IFN-ДК. При этом гранулоопосредованный механизм вносит значительный вклад в эффективный киллинг опухолевых клеток. Об этом свидетельствует отсутствие блокирующего эффекта СМА при исходно низком уровне цитотоксичности IFN-ДК против клеток глиобластомы и выраженный ингибирующий эффект СМА при высокой цитотоксической активности IFN-ДК.

Благодарности

Исследование поддержано грантом Президента Российской Федерации государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук (МК-7611.2016.7) и грантом РФФИ № 16-34-00711.

Список литературы / References

1. Aktas E., Kucuksezer U.C., Bilgic S., Erten G., Deniz G., Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol.*, 2009, Vol. 254, pp. 149-154.
2. Alter G., Malenfant J.M., Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods*, 2004, Vol. 294, no. 1-2, pp. 15-22.
3. Anguille S., Lion E., Tel J., de Vries I.J.M., Couderé K., Fromm P.D., Van Tendeloo V.F., Smits E.L., Berneman Z.N. Interleukin-15-induced CD56⁺ myeloid dendritic cells combine potent tumor antigen presentation with direct tumoricidal potential. *PLoS One*, 2012, Vol. 7, e51851. doi:10.1371/journal.pone.0051851.
4. Banchereau J., Steinman R.M. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 1998, Vol. 392, pp. 245-252.
5. Barcia C. Jr., Gómez A., Gallego-Sanchez J.M., Perez-Vallés A., Castro M.G., Lowenstein P.R., Barcia C., Herrero M.-T. Infiltrating CTLs in human glioblastoma establish immunological synapses with tumorigenic cells. *Am. J. Pathol.*, 2009, Vol. 175, pp. 786-798.
6. Bellail A.C., Tse M.C., Song J.H., Phuphanich S., Olson J.J., Sun S.Y., Hao C. DR5-mediated DISC controls caspase-8 cleavage and initiation of apoptosis in human glioblastomas. *J. Cell Mol. Med.*, 2010, Vol. 14, no. 6A, pp. 1303-1317.
7. Bratke K., Nielsen J., Manig F., Klein C., Kuepper M., Geyer S., Julius P., Lommatzsch M., Virchow J.C. Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. *Clin. Exp. Allergy*, 2010, Vol. 40, pp. 1015-1024.
8. Capper D., Gaiser T., Hartmann C., Habel A., Mueller W., Herold-Mende C., von Deimling A., Siegelin M.D. Stem-cell-like glioma cells are resistant to TRAIL/Apo2L and exhibit down-regulation of caspase-8 by promoter methylation. *Acta Neuropathol.*, 2009, Vol. 117, no. 4, pp. 445-456.
9. Choi B.D., Gedeon P.C., Herndon J.E., Archer G.E., Reap E.A., Sanchez-Perez L., Mitchell D.A., Bigner D.D., Sampson J.H. Human regulatory T cells kill tumor cells through granzyme-dependent cytotoxicity upon retargeting with a bispecific antibody. *Cancer Immunol. Res.*, 2013, Vol. 1, no. 3, pp. 163-167.
10. Clément M.V., Haddad P., Soulié A., Legros-Maida S., Guillet J., Cesar E., Sasportes M. Involvement of granzyme B and perforin gene expression in the lytic potential of human natural killer cells. *Res Immunol.*, 1990, Vol. 141, no. 6, pp. 477-489.
11. Cullen S.P., Brunet M., Martin S.J. Granzymes in cancer and immunity. *Cell Death Differ.*, 2008, Vol. 17, no. 4, pp. 616-623.
12. Fanger N.A., Maliszewski C.R., Schooley K., Griffith T.S. Human dendritic cells mediate cellular apoptosis via tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). *J. Exp. Med.*, 1999, Vol. 190, pp. 1155-1164.
13. Jahrsdörfer B., Vollmer A., Blackwell S.E., Maier J., Sontheimer K., Beyer T., Mandel B., Lunov O., Tron K., Nienhaus G.U., Simmet T., Debatin K.M., Weiner G.J., Fabricius D. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood*, 2010, Vol. 115, no. 6, pp. 1156-1165.
14. Janjic B.M., Lu G., Pimenov A., Whiteside T.L., Storkus W.J., Vujanovic N.L. Innate direct anticancer effector function of human immature dendritic cells. I. involvement of an apoptosis-inducing pathway. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 168, pp. 1823-1830.
15. Karrich J.J., Jachimowski L.C.M., Nagasawa M., Kamp A., Balzarolo M., Wolkers M.C., Uittenbogaart C.H., Marieke van Ham S., Blom B. IL-21-stimulated human plasmacytoid dendritic cells secrete granzyme B, which impairs their capacity to induce T-cell proliferation. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 16, pp. 3103-3111.
16. Kataoka T., Takaku K., Magae J., Shinohara N., Takayama H., Kondo S., Nagai K. Acidification is essential for maintaining the structure and function of lytic granules of CTL. Effect of concanamycin A, an inhibitor of vacuolar type H⁽⁺⁾-ATPase, on CTL-mediated cytotoxicity. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 9, pp. 3938-3947.
17. Korthals M., Safaian N., Kronenwett R., Maihöfer D., Schott M., Papewalis C., Diaz Blanco E., Winter M., Czibere A., Haas R., Kobbe G., Fenk R. Monocyte derived dendritic cells generated by IFN- α acquire mature dendritic and natural killer cell properties as shown by gene expression analysis. *J. Transl. Med.*, 2007, Vol. 5, p. 46.
18. Krzewski K., Gil-Krzewska A., Nguyen V., Peruzzi G., Coligan J.E. LAMP1/CD107a is required for efficient perforin delivery to lytic granules and NK-cell cytotoxicity. *Blood*, 2013, Vol. 121, no. 23, pp. 4672-4683.
19. Liu Sh., Yu Y., Zhang M., Wang W., Cao X. The involvement of TNF- α -related apoptosis-inducing ligand in the enhanced cytotoxicity of IFN- β -stimulated human dendritic cells to tumor cells. *J. Immunol.*, 2001, Vol. 166, no. 9, pp. 5407-5415.
20. Mori S., Jewett A., Murakami-Mori K., Cavalcanti M., Bonavida B. The participation of the Fas-mediated cytotoxic pathway by natural killer cells is tumor-cell-dependent. *Cancer Immunol. Immunother.*, 1997, Vol. 44, pp. 282-290.
21. Ogbomo H., Zemp F.J., Lun X., Zhang J., Stack D., Rahman M.M., Mcfadden G., Mody C.H., Forsyth P.A. Myxoma virus infection promotes NK lysis of malignant gliomas *in vitro* and *in vivo*. *PLoS One*, 2013, Vol. 8, e66825. doi:10.1371/journal.pone.0066825.
22. Papewalis C., Jacobs B., Wuttke M., Ullrich E., Baehring T., Fenk R., Willenberg H.S., Schinner S., Cohnen M., Seissler J., Zacharowski K., Scherbaum W.A., Schott M. IFN- α skews monocytes into CD56⁺-expressing dendritic cells with potent functional activities *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.*, 2008, Vol. 180, pp. 1462-1470.

23. Renner D., Jin F., Parney I., Pirko I., Pavelko K., Johnson A. A duality of roles for perforin in CD8⁺ T cell-glioma interactions: contributions to cytotoxicity and altered vascular permeability. *Neuro Oncol.*, 2014, Vol. 16 (suppl. 5), v109. doi:10.1093/neuonc/nou257.10.
24. Stary G., Bangert C., Tauber M., Strohal R., Kopp T., Stingl G. Tumoricidal activity of TLR7/8-activated inflammatory dendritic cells. *J. Exp. Med.*, 2007, Vol. 204, pp. 1441-1451.
25. Tyrinova T.V., Leplina O.Y., Mishinov S.V., Tikhonova M.A., Shevela E.Y., Stupak V.V., Pendyurin I.V., Shilov A.G., Alyamkina E.A., Rubtsova N.V., Bogachev S.S., Ostanin A.A., Chernykh E.R. Cytotoxic activity of ex-vivo generated IFN α -induced monocyte-derived dendritic cells in brain glioma patients. *Cell Immunol.*, 2013, Vol. 284, pp. 146-153.
26. Vanderheyde N., Vandenabeele P., Goldman M., Willems F. Distinct mechanisms are involved in tumoricidal and tumoricidal activities of monocyte-derived dendritic cells. *Immunol. Lett.*, 2004, Vol. 91, no. 2-3, pp. 99-101.
27. Zhang B., Zhang J., Tian Z. Comparison in the effects of IL-2, IL-12, IL-15 and IFN α on gene regulation of granzymes of human NK cell line NK-92. *Int. Immunopharmacol.*, 2008, Vol. 8, pp. 989-996.

Авторы:

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

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

Мишинов С.В. — к.м.н., врач-нейрохирург отделения нейрохирургии ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

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

Калиновский А.В. — к.м.н., заведующий операционным блоком ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Чернов С.В. — к.м.н., заведующий отделением нейроонкологии ФГБУ «Федеральный центр нейрохирургии» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

Ступак В.В. — д.м.н., профессор, зав. отделением нейрохирургии ФГБУ «Научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия

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

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

Authors:

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

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

Mishinov S.V., PhD (Medicine), Neurosurgeon, Neurosurgery Department, Ya. L. Tsivyan Research Institute of Traumatology and Orthopedics, 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

Kalinovskiy A.V., PhD (Medicine), Head, Surgical Unit, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Chernov S.V., PhD (Medicine), Head, Neurooncology Department, Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Russian Federation

Stupak V.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Neurosurgery Department, Ya. L. Tsivyan Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russian Federation

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

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

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 2 И TOLL-ПОДОБНОГО РЕЦЕПТОРА 4 У ДЕТЕЙ С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

Ганковская Л.В.¹, Намазова-Баранова Л.С.^{1,2}, Хорева М.В.¹,
Брагвадзе Б.Г.¹, Огурцова А.Д.¹, Алексеева А.А.^{1,2}, Ганковский В.А.²,
Свитич О.А.¹

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

² ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ,
Москва, Россия

Резюме. В настоящее время в литературе активно обсуждается неоднозначная роль распознающих рецепторов врожденного иммунитета, в частности TLRs, в иммунопатогенезе бронхиальной астмы (БА).

Цель нашей работы — исследование экспрессии TLR2 и TLR4 на уровне клеток слизистой полости носа и лейкоцитов периферической крови (ЛПК) больных БА разной степени тяжести.

В исследование были включены 40 детей с БА (3–12 лет) и 10 здоровых детей того же возраста. Методом ПЦР-РВ оценивали экспрессию генов TLR2 и TLR4 в соскобах со слизистой полости носа и в ЛПК; методом проточной цитометрии определяли процент моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 TLR4, и интенсивность их экспрессии; методом мультиплексного иммунофлуоресцентного анализа оценивали уровень про- и противовоспалительных цитокинов (IL-1β, IL-1α, IL-6, IL-8, IL-10, TNFα) в назальных смывах.

В результате проведенного исследования выявлена гиперактивация факторов врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки полости носа у больных с БА, проявляющаяся повышением экспрессии генов TLR2, TLR4 и выработки как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов. Выявлена связь между уровнем цитокинов и степенью тяжести бронхиальной астмы. В периферической крови определено достоверное увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих CD14⁺ моноцитах у детей с БА.

Таким образом, показано увеличение экспрессии генов TLRs слизистой полости носа и повышение поверхностной экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих моноцитах больных бронхиальной астмой по сравнению со здоровыми детьми. Выявленные изменения свидетельствуют о вовлечении системы TLRs в иммунопатогенез бронхиальной астмы. В дальнейшем TLRs могут быть использованы в качестве маркеров прогноза течения БА и возможных терапевтических мишеней.

Ключевые слова: TLR2, TLR4, провоспалительные цитокины, экспрессия гена, проточная цитометрия, бронхиальная астма

Адрес для переписки:

Брагвадзе Белла Гелаевна
ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский
медицинский университет им. Н.И. Пирогова»
Министерства здравоохранения РФ
117513, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1, стр. 9.
Тел.: 8 (925) 302-01-63.
E-mail: b.bragvadze@mail.ru

Address for correspondence:

Bragvadze Bella G.
Russian National N. Pirogov Research Medical University
117513, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanova str., 1,
bldg 9.
Phone: 7 (925) 302-01-63.
E-mail: b.bragvadze@mail.ru

Образец цитирования:

Л.В. Ганковская, Л.С. Намазова-Баранова, М.В. Хорева,
Б.Г. Брагвадзе, А.Д. Огурцова, А.А. Алексеева,
В.А. Ганковский, О.А. Свитич «Особенности экспрессии
Toll-подобного рецептора 2 и Toll-подобного рецептора 4
у детей с бронхиальной астмой» // Медицинская
иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 431–440.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440

© Ганковская Л.В. и соавт., 2017

For citation:

L.V. Gankovskaya, L.S. Namazova-Baranova, M.V. Khoreva,
B.G. Bragvadze, A.D. Ogurtsova, A.A. Alekseeva,
V.A. Gankovskii, O.A. Svitich "Expression features of Toll-like
receptor 2 and Toll-like receptor 4 in children with asthma",
Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya,
2017, Vol. 19, no. 4, pp. 431–440.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-431-440

EXPRESSION FEATURES OF TOLL-LIKE RECEPTOR 2 AND TOLL-LIKE RECEPTOR 4 IN CHILDREN WITH ASTHMA

Gankovskaya L.V.^a, Namazova-Baranova L.S.^{a, b}, Khoreva M.V.^a,
Bragvadze B.G.^a, Ogurtsova A.D.^a, Alekseeva A.A.^{a, b}, Gankovskii V.A.^b,
Svitich O.A.^a

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

^b National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Abstract. Currently actively discussed the role of innate immunity receptors, in particular TLRs in the immunopathogenesis of bronchial asthma (BA).

The aim of our work was to study the expression of TLR2 and TLR4 on the nasal mucosal cells and peripheral blood leukocytes of patients with BA of different severity.

The study included 40 children with asthma (3-12 years) and 10 healthy children. Methods: real-time PCR, flow cytometry and multiplex immunofluorescence analysis evaluated the levels of pro- and anti-inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α) in nasal swabs.

The result of the study - hyperactivation of the factors of innate immunity at the level of the mucosal of the nasal cavity in patients with asthma, manifested by increased gene expression of TLR2, TLR4, and production of proinflammatory as well as anti-inflammatory cytokines. Correlation between cytokine levels and the severity of asthma. In the peripheral blood identified a significant increase in the expression of TLR2 and TLR4 on circulating CD14⁺ monocytes in children with BA.

Thus, the increase of gene expression of TLRs mucosa of the nasal cavity, increase surface expression of TLR2 and TLR4 on circulating monocytes of patients with bronchial asthma compared to healthy children. The revealed changes indicate the involvement of the system of TLRs in the immunopathogenesis of bronchial asthma. In the future, TLRs can be used as markers to predict the course of ad and possible therapeutic targets.

Keywords: TLR2, TLR4, proinflammatory cytokines, expression, flow cytometry, asthma

Введение

Бронхиальная астма (БА) является наиболее распространенным респираторным заболеванием в мире. Это хроническое воспалительное заболевание нижних дыхательных путей, характеризующееся тяжелой обратимой обструкцией, дыхательной гиперчувствительностью и прогрессирующим течением. На сегодняшний день количество больных БА в России приближается к 12 млн человек, при этом доля детского населения составляет 20% [6].

Ключевую роль в патогенезе БА отводят IgE-опосредованному механизму формирования атопического фенотипа [8]. Частые респираторные инфекции провоцируют обострение астмы у детей. Однако данные механизмы недостаточно изучены. В последнее время активно исследуется роль врожденного иммунитета в патогенезе БА.

Известно, что врожденный иммунитет представляет первую линию защиты организма от патогенов. Ключевыми распознающими рецепторами врожденного иммунитета являются Toll-подобные рецепторы (TLRs), экспрессируемые в большей степени на клетках иммунной системы, слизистых оболочек и кожи [3]. Распозна-

вая консервативные структуры патогенов, TLRs активируют сигнальные пути, индуцирующие транскрипцию генов хемокинов, цитокинов, что приводит к развитию воспаления.

Наиболее важным представляется изучение TLR2 и TLR4, т.к. данные рецепторы распознают широкий спектр лигандов. В частности, TLR2 распознает PAMP (pathogen-associated molecular pattern) грамположительных бактерий, микоплазм и дрожжей, в то время как TLR4 активируется в ответ на граммотрицательные бактерии, белки теплового шока, а также аллергены [3, 5]. В последние годы показано, что аллергены, загрязненные бактериальным ЛПС, активируют TLR2- и TLR4-опосредованные механизмы, вызывающие переключение дифференцировки Т-лимфоцитов по пути Th2-клеток

Имеются противоречивые данные о роли этих рецепторов в патогенезе БА. В исследовании Krespo-Lesmana и соавт. показано увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 на клетках макрофагально-моноцитарного ряда и отсутствие изменений экспрессии на нейтрофилах [9]. В то же время, по данным Расе и соавт., обнаружено снижение TLR2 и TLR4 в клетках пациен-

тов с БА по сравнению с контрольной группой [13].

Diogenes S. Ferreira и соавт. выявили увеличение экспрессии TLR2, TLR3 и TLR4 на эпителиальных клетках слизистых дыхательных путей у пациентов с тяжелой БА иммуногистохимическим методом [10]. До сих пор не проведено сравнительной оценки экспрессии генов и молекул распознающих рецепторов TLR2 и TLR4 на слизистой оболочке респираторного тракта и лейкоцитах периферической крови. Отсутствуют данные об уровне экспрессии TLRs в зависимости от тяжести заболевания. Исследование роли TLRs в аллергическом воспалении важно для совершенствования программ профилактики и лечения БА.

Цель данной работы — исследование экспрессии рецепторов врожденного иммунитета (TLR2, TLR4) на уровне клеток слизистой оболочки полости носа и лейкоцитов периферической крови больных с бронхиальной астмой разной степени тяжести.

Материалы и методы

В исследование включено 40 пациентов с бронхиальной астмой в возрасте от 3-х до 12-ти лет, находившихся на обследовании в отделении аллергологии ФГАУ «ННПЦЗД» Министерства здравоохранения РФ. Критерием для включения в исследование явилось наличие у детей установленного диагноза бронхиальная астма, отсутствие на момент исследования вирусной инфекции, острых воспалительных заболеваний, патологии ЛОР-органов. Контрольную группу составили 10 здоровых детей того же возраста.

Исследуемые пациенты были поделены на 2 группы, в зависимости от степени тяжести. 27 пациентов с установленным диагнозом БА средней степени тяжести вошли в группу I. Группа II включала 13 детей с тяжелой степенью БА. Диагноз устанавливался в соответствии с критериями GINA (2015).

В качестве исследуемого материала в работе были использованы соскобы слизистой оболочки полости носа, полученные с помощью «цитощетки» тип D, смывы из полости носа [1], а также цельная кровь, собранная в пробирки с ЭДТА.

Оценка экспрессии генов TLRs в соскобах со слизистых полости носа и лейкоцитах больных БА и здоровых детей

Для оценки экспрессии генов TLR2, TLR4 проводился метод полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Первонач-

ально получали лейкомассу из цельной крови строго в соответствии с протоколом, с использованием стерильного 6% раствора декстрана, серии отмывок и центрифугирования (ссылка на практикум). Из лейкоцитов крови и соскобов со слизистой оболочки выделяли общую РНК методом аффинной сорбции на частицах силикагеля, используя набор для выделения РНК «АмплиПРАЙМРибо-сорб» (ИнтерЛабСервис, Россия) по инструкции производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием «Набора для проведения реакции обратной транскрипции» (Синтол, РФ) для синтеза первой цепи ДНК на матрице РНК интересующего гена (TLR2, TLR4) для последующего определения числа копий с помощью ПЦР в реальном времени. Реакцию проводили с применением «Набора реагентов для проведения ПЦР-РВ в присутствии SYBRGreenI» и праймеров, синтезированных на фирме «Синтол», РФ. Количество копий кДНК исследуемых генов рассчитывалось относительно актина. Реакцию проводили в амплификаторе ДТ-96.

Оценка экспрессии TLR2, TLR4 на лейкоцитах периферической крови

Экспрессию молекул TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови оценивали методом проточной цитометрии. 100 мкл цельной крови инкубировали с мечеными МАТ в течение 10 минут, затем осуществляли лизис эритроцитов с помощью лизирующего раствора IOTest 3 LysingSolution (BeckmanCoulter, США), после чего клетки отмывали при 1000 об/мин в растворе Хенкса. Анализ образцов клеточных суспензий проводили на проточном цитометре Beckman Coulter Navios (BeckmanCoulter, США). В каждом образце было проанализировано не менее 100000 событий. Для идентификации клеток использовали следующие моноклональные антитела: CD14, меченые APC (e-Biosciences), CD45, меченые ECD (e-Biosciences), CD282 (TLR2) и CD 284 (TLR4), меченые Alexa Fluor 488 (e-Biosciences), изотипический контроль Mouse IgG2a, меченые Alexa Fluor 488 (e-Biosciences). Анализ образцов проводили на проточном цитометре «Navios» (Beckman coulter, Inc.). Оценивали процент CD14⁺ моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 или TLR4, а также среднюю интенсивность экспрессии (СИФ) этих рецепторов на клетках периферической крови у больных бронхиальной астмой и здоровых доноров. Среднюю интенсивность флуоресценции рассчитывали как отношение интенсивности

флуоресценции образца на интенсивность флуоресценции изотипического контроля.

Определение цитокинов в назальных смывах

Для определения содержания цитокинов (IL-1 β , IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, TNF α) в назальных смывах проводили мультиплексный иммунофлуоресцентный анализ (Bio-Plex MAGPIX Multiplex Reader, США), с помощью набора Bio-Plex Pro Assays строго по протоколу фирмы-производителя. Перед исследованием все пробы доводили до комнатной температуры (18-25 °C), аккуратно перемешивали и проводили оценку содержания белка на микроспектрофотометре NanoDrop™ 2000. В качестве материала исследования для проведения иммунофлуоресцентного анализа были использованы смывы со слизистой полости носа пациентов с БА и здоровых детей. Для получения назального смыва в носовую ход вводили по 1 мл теплого стерильного изотонического раствора натрия хлорида. Промывную жидкость собирали в одну стерильную пробирку. Содержание цитокинов представлено в пикограммах в пересчете на миллиграмм белка.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6. Данные представлены в виде медианы и 25-75 перцентилей. Достоверные различия между исследуемыми группами рассчитывали с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни. Достоверными считались данные с коэффициентом $p < 0,05$.

Результаты

На первом этапе работы проводилась оценка экспрессии генов TLR2, TLR4 в соскобах со слизистых полости носа и определение про- и проти-

вовоспалительных цитокинов в назальных смывах у больных с БА и здоровых детей. В соскобах со слизистой полости носа у пациентов со среднетяжелой БА выявлено достоверное увеличение экспрессии гена TLR2 в 3,1 раза ($p = 0,03$), гена TLR4 в 10,6 раз в сравнении с группой контроля ($p = 0,02$) (табл. 1).

У детей с тяжелой БА также обнаружено достоверное повышение экспрессии гена TLR2 в 4,8 раза по сравнению с показателем в группе здоровых детей ($p = 0,03$). Показатели экспрессии генов TLR4 в данной группе пациентов повышены, но не являются статистически достоверными (табл. 1).

Анализ результатов оценки спектра цитокинов выявил закономерное увеличение содержания провоспалительных цитокинов в смывах из полости носа больных с БА в зависимости от степени тяжести. В образцах пациентов с тяжелой астмой содержание исследуемых провоспалительных цитокинов было выше по сравнению с показателями у больных среднетяжелой БА (рис. 1). Так, у пациентов группы II содержание IL-1, IL-6 и TNF α составило: 45 (35,4-54,6) пг/мг; 6,6 (6,3-7) пг/мг и 17,0 (15,6-19,1) пг/мг соответственно. Эти показатели превышали показатели здоровых детей ($P \leq 0,05$). Содержание цитокинов в назальных смывах здоровых детей составило для IL-1 – 10,0 (9,7-11,2) пг/мг; для IL-6 – 1,4 (1,3-2,5) пг/мг; для TNF α – 3 (2,5-6,8) пг/мг. В группе I также отмечается тенденция к повышению уровня провоспалительных цитокинов, относительно контроля, но не является достоверной (рис. 1).

Концентрация IL-8 у детей с тяжелой БА в 10,5 раз превышала этот показатель в образцах

ТАБЛИЦА 1. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ TLR2 И TLR4 В СОСКОБАХ СО СЛИЗИСТЫХ ПОЛОСТИ НОСА ПАЦИЕНТОВ С БА И ЗДОРОВЫХ ДОНОРОВ

TABLE 1. EXPRESSION OF TLR2 AND TLR4 IN SCRAPINGS FROM THE NASAL MUCOSA OF PATIENTS WITH AD AND HEALTHY DONORS

Группы наблюдения Groups	I группа Group I	II группа Group II	Здоровые дети Healthy children
TLR			
TLR2	110 411 (40 691-129 024)*	168 006 (74 147-217 358)*	34 840 (12 573-56 162)
TLR4	713 (684-962)*	205 (45-342)	67 (36-388)

Примечание. I группа – больных БА средней степени тяжести; II группа – больные БА тяжелой степени тяжести. * – статистически значимое отличие от группы здоровых доноров ($p < 0,05$).

Note. Group I, patients with moderate BA. Group II, patients with severe asthma severity. *, statistically significant difference ($p < 0.05$).

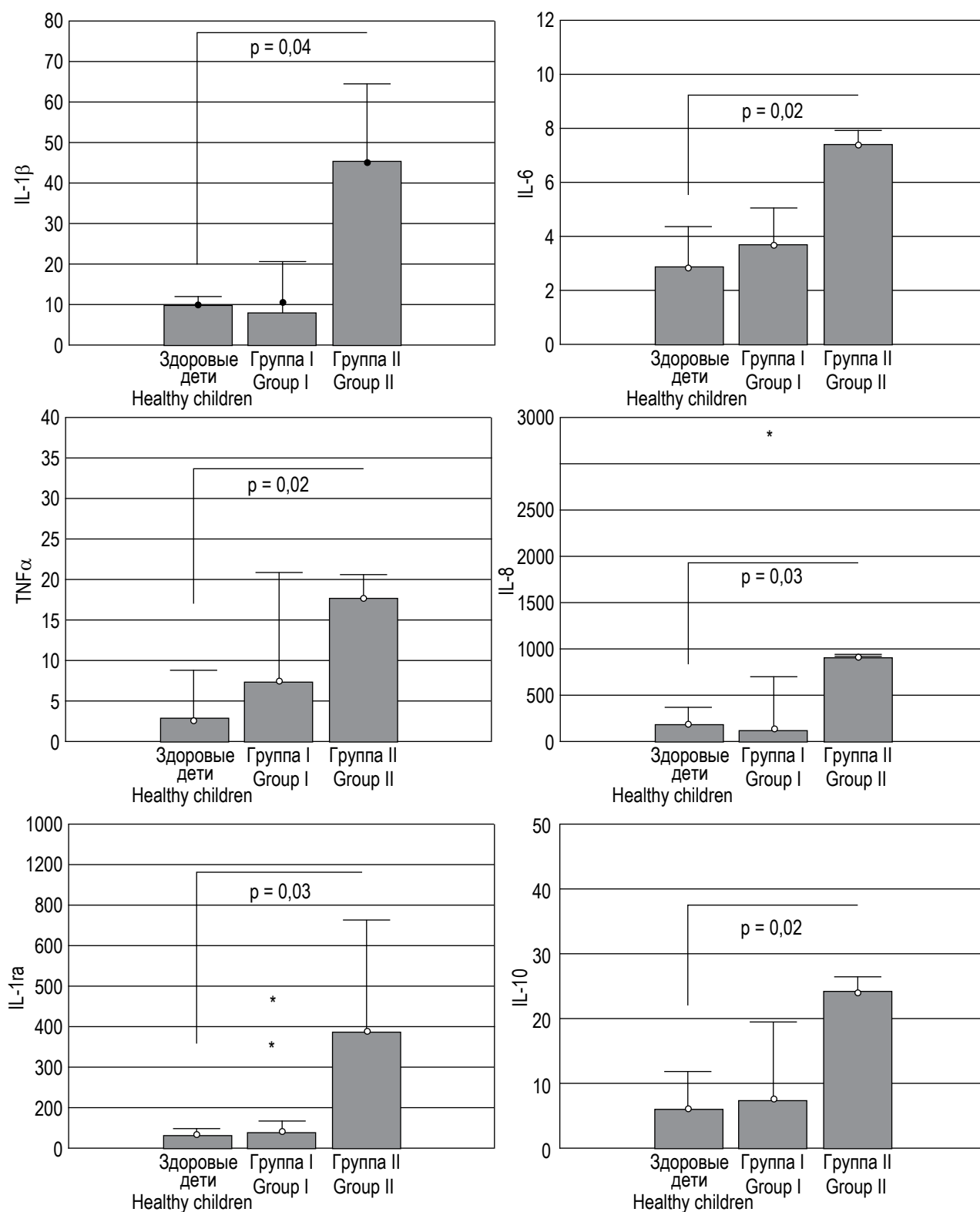


Рисунок 1. Содержание цитокинов в смывах со слизистой полости носа у здоровых детей и больных бронхиальной астмой

Примечание. I группа – больных БА средней степени тяжести; II группа – больные БА тяжелой степени тяжести. По оси ординат: содержание цитокинов, в расчете на пг/мг белка.

Figure 1. Cytokine content in the lavages from the nasal cavity in healthy children and patients with bronchial asthma

Note. Group I, patients with moderate BA. Group II, patients with severe asthma severity. The Y-axis: cytokine concentration normalized per 1 mg of protein.

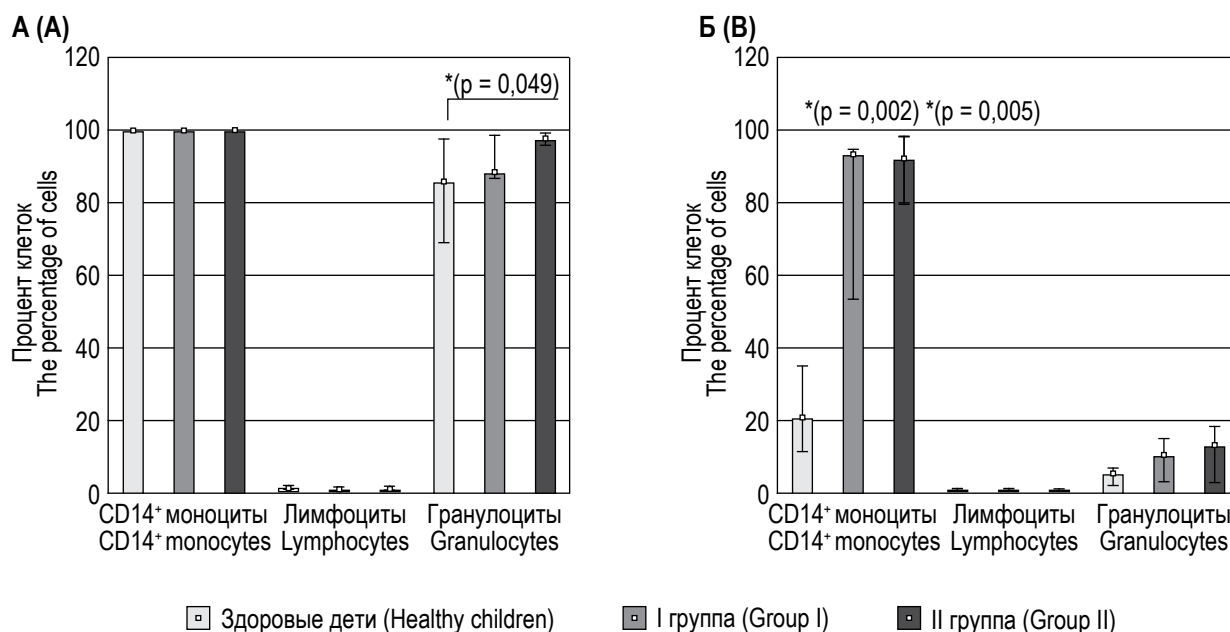


Рисунок 2. Процент клеток периферической крови, экспрессирующих на своей поверхности TLR2 (А) и TLR4 (Б), у здоровых детей и больных бронхиальной астмой

Примечание. По оси ординат: процент клеток, по оси абсцисс: наименование клеточной субпопуляции. * – статистически значимое отличие от группы здоровых детей ($p < 0,05$). I группа – больные БА средней степени тяжести, II группа – больные БА тяжелой степени тяжести.

Figure 2. The percentage of peripheral blood cells expressing of TLR2 (A) and TLR4 (B) in healthy children and asthmatic patients. Note. The Y-axis: the percentage of cells; on the X-axis: cell population. *, statistically significant difference from the group of healthy children ($p < 0.05$). Group I, patients with moderate asthma. Group II, patients with severe asthma.

здоровых детей. Параллельно в смывах из полости носа оценивали уровень противовоспалительных цитокинов. Содержание IL-1ra у больных среднетяжелой БА составило 66 (41,6-106,8) пг/мг, что сопоставимо с группой контроля (60 [55-70,6] пг/мг). При этом у пациентов с тяжелой формой отмечается существенное повышение содержания IL-1ra в 9,5 раз по сравнению с группой здоровых детей. Подобные результаты были выявлены и при анализе показателей противовоспалительного цитокина IL-10 в исследуемых группах. Наиболее значимые различия содержания этого цитокина установлены у больных с тяжелой БА (23 [21,8-24,5] пг/мг) в сравнении с группой I (7,3 [2,4-16,6] пг/мг) и контролем (5,2 [3,3-11,6] пг/мг) (рис. 1).

Следующий этап исследования включал оценку экспрессии генов TLRs в лейкоцитах периферической крови. При сравнении показателей в группе детей с тяжелой степенью БА было выявлено снижение экспрессии гена TLR2 в 22 раза (13 565 [3 833-19 372] относительного числа копий кДНК) по сравнению с показателями у здоровых детей (294 132 [109 020-377 141], $p = 0,02$). При этом экспрессия TLR4 (74 [61-394] относитель-

ного числа копий кДНК) была сопоставима с показателями в контрольной группе (86 [24-1029]).

Тенденция к снижению экспрессии генов TLR2 и TLR4 сохраняется и в группе с БА средней степени тяжести, но не является достоверной. Получив данные о снижении экспрессии генов TLR2 и TLR4 в лейкоцитах больных БА, был проведен анализ экспрессии TLR2 и TLR4 на поверхности CD14⁺ моноцитов, лимфоцитов и гранулоцитов периферической крови исследуемых пациентов по сравнению с группой здоровых детей.

У детей с БА средней степени тяжести не выявили изменений количества клеток периферической крови, экспрессирующих TLR2, по сравнению со здоровыми детьми (рис. 2). В группе детей с тяжелым течением БА обнаружено повышение количества гранулоцитов, экспрессирующих TLR2 ($p = 0,049$). При анализе интенсивности экспрессии TLR2 на лейкоцитах периферической крови установили, что в обеих группах больных достоверно увеличена интенсивность экспрессии TLR2 на CD14⁺ моноцитах ($p = 0,02$ в I группе и $p = 0,048$ во II группе), не выявлено изменений интенсивности экспрессии

ТАБЛИЦА 2. СРЕДНЯЯ ИНТЕНСИВНОСТЬ ЭКСПРЕССИИ TLR2 И TLR4 НА КЛЕТКАХ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ЗДОРОВЫХ ДЕТЕЙ И БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ

TABLE 2. MEAN FLUORESCENCE INTENSITY OF TLR2 AND TLR4 ON PERIPHERAL BLOOD CELLS IN HEALTHY CHILDREN AND PATIENTS WITH BRONCHIAL ASTHMA

		Здоровые дети Healthy children	I группа Group I	II группа Group II
TLR2	CD14⁺ моноциты CD14 ⁺ monocytes	9,64 (8,73-10,8)	15,08 (13,9-9,1)*	12,3 (10,4-22,7)*
	Лимфоциты Lymphocytes	1,39 (1,19-1,54)	1,08 (1,03-,17)*	1,17 (1,12-1,23)*
	Гранулоциты Granulocytes	2,27 (1,8-2,4)	2,4 (2,31-3,25)	2,62 (2,2-5,2)
TLR4	CD14⁺ моноциты CD14 ⁺ monocytes	1,52 (1,48-1,67)	1,8 (1,6-2,62)*	2,16 (1,74-2,3)*
	Лимфоциты Lymphocytes	1,08 (1,01-1,14)	1,08 (1-1,12)	1,04 (0,99-1,07)
	Гранулоциты Granulocytes	4,41 (3,33-4,84)	3,26 (2,5-3,6)*	2,51 (1,67-3)*

Примечание. I группа – больных БА средней степени тяжести; II группа – больные БА тяжелой степени тяжести. СИФ представлены в относительных единицах. * – статистически значимое отличие от группы здоровых доноров ($p < 0,05$).

Note. Group I, patients with moderate asthma. Group II, patients with severe asthma. MFI presented in relative units. *, statistically significant difference ($p < 0.05$).

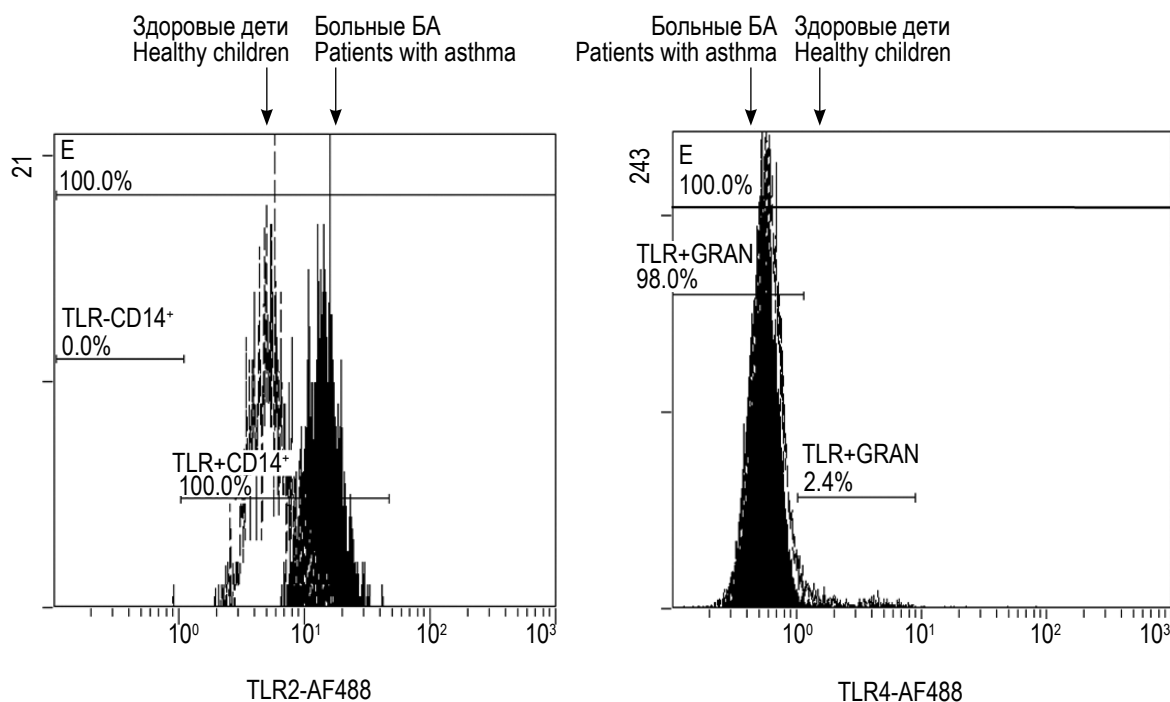


Рисунок 3. Средняя интенсивность экспрессии TLR2 на CD14⁺ моноцитах (слева) и TLR4 на гранулоцитах (справа)

Figure 3. Mean fluorescence intensity of TLR2 (left) on CD14⁺ monocytes and TLR4 on granulocytes (right)

TLR2 на гранулоцитах. Интенсивность экспрессии TLR2 на лимфоцитах периферической крови больных БА средней и тяжелой степени тяжести достоверно снижена по сравнению со здоровыми детьми ($p = 0,005$ и $p = 0,03$ соответственно) (табл. 2, рис. 3).

При оценке экспрессии TLR4 на клетках периферической крови больных БА выявили повышение CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLR4 в обеих группах ($p = 0,005$ в I группе и $p = 0,002$ во II группе), при этом изменений количества лимфоцитов и гранулоцитов, экспрес-

сирующих TLR4, не обнаружено (рис. 2). Установили, что в обеих группах детей с БА увеличена интенсивность экспрессии TLR4 на CD14⁺ моноцитах ($p = 0,04$ в I группе и $p = 0,009$ во II группе). В обеих группах больных БА наблюдали снижение интенсивности экспрессии TLR4 на гранулоцитах по сравнению с показателями в группе здоровых детей ($p = 0,04$ и $p = 0,044$ соответственно) (табл. 2). Изменений интенсивности экспрессии TLR4 на лимфоцитах периферической крови у детей с БА не выявлено.

Обсуждение

В настоящее время активно исследуется роль врожденного иммунитета в патогенезе БА. Клетки слизистой оболочки рассматриваются как иммунологически активный барьер, через который проникают возбудители, повреждая мерцательный эпителий респираторного тракта, увеличивая его проницаемость для аллергенов, токсических веществ, усиливая тем самым гиперреактивность бронхов. Toll-подобные рецепторы широко представлены на клетках слизистых оболочек респираторного тракта. В последние годы изучается роль TLRs в развитии аллергического воспаления. Обсуждается их участие в распознавании не только патогенов, но и аллергенов, токсических веществ и др. [7]. В результате активации TLRs происходит запуск каскада сигнальных молекул, приводящих к экспрессии генов про- и противовоспалительных цитокинов, хемокинов, костимуляторных молекул. В итоге в очаг воспаления привлекаются нейтрофилы, моноциты, активируются дендритные клетки легких и макрофаги, индуцируется Th2-тип иммунного ответа.

В настоящем исследовании показано существенное увеличение экспрессии генов TLR2 и TLR4 на уровне слизистой оболочки полости носа. Эти данные подтверждают результаты, полученные D.S. Ferreira и соавт. с помощью иммуногистохимического метода об увеличении экспрессии молекул рецепторов TLR2, TLR3 и TLR4 на эпителиальных клетках респираторного тракта больных с тяжелой формой БА [10, 16].

Ранее нами проведена оценка уровня экспрессии гена противомикробного пептида HBD1 на слизистой полости носа [2]. Известно, что HBD1, вырабатываемый эпителием слизистой оболочки респираторного тракта, оказывает прямое противомикробное действие и предотвращает вторжение патогенов в слизистую. Обнаружено снижение экспрессии гена HBD1 у пациентов

с БА по сравнению со здоровыми детьми. Таким образом, выявлен дисбаланс факторов врожденного иммунитета на уровне слизистой оболочки полости носа у больных с БА, сопровождающийся повышением экспрессии генов TLR2, TLR4 и снижением экспрессии гена HBD1. Более того, в настоящем исследовании дисбаланс факторов врожденного иммунитета подтвержден высоким уровнем как провоспалительных, так и противовоспалительных цитокинов в назальных смывах. Выявлена прямая зависимость от стадии БА, характеризующаяся возрастающим содержанием цитокинов в зависимости от тяжести заболевания [11, 14].

Параллельно с оценкой экспрессии генов TLR2 и TLR4 на слизистой полости носа проведен анализ экспрессии данных генов в лейкоцитах периферической крови. В лейкоцитах выявлено снижение экспрессии генов TLR2, TLR4, что говорит о локальном характере воспаления [4].

При оценке экспрессии TLR2 и TLR4 на поверхности клеток периферической крови установили, что у детей с тяжелым течением БА достоверно выше процент CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLR4 и гранулоцитов, экспрессирующих TLR2. При этом у детей со среднетяжелой БА увеличен только процент CD14⁺ моноцитов, экспрессирующих TLR4. Интенсивность экспрессии TLR2 и TLR4 на CD14⁺ моноцитах увеличена в обеих группах по сравнению со здоровыми детьми. У детей со среднетяжелым и тяжелым течением БА выявили снижение интенсивности экспрессии TLR2 на лимфоцитах и снижение интенсивности экспрессии TLR4 на гранулоцитах. Таким образом, данное исследование показало увеличение экспрессии TLR2 и TLR4 на циркулирующих CD14⁺ моноцитах периферической крови у детей с бронхиальной астмой по сравнению с группой здоровых детей.

Согласно данным литературы, циркулирующие моноциты периферической крови играют существенную роль в развитии и поддержании аллергического воспаления [15]. Моноциты способны мигрировать в подслизистую оболочку бронхов, где продуцируют провоспалительные цитокины и хемокины, таким образом, принимая участие в развитии и поддержании хронического воспаления. На основании выявленных изменений в экспрессии TLR2 и TLR4 на лейкоцитах периферической крови детей с БА можно предположить, что циркулирующие моноциты периферической крови у детей в ис-

следуемых группах преактивированы. Ранее на кафедре иммунологии РНИМУ им Н.И. Пирогова было показано, что спонтанная и ЛПС-индуцированная продукция про- и противовоспалительных цитокинов МНК периферической крови в культуре *in vitro* у больных БА выше, чем у здоровых доноров, что свидетельствует о повышенной функциональной активности TLR4 на МНК больных БА [12].

Таким образом, выявленные изменения в экспрессии генов TLR2 и TLR4 в соскобах со слизистых полости носа, лейкоцитах периферической крови и TLR2 и TLR4 на поверхности CD14⁺ моноцитов, гранулоцитов или лимфоцитов больных БА свидетельствуют о вовлечении этих рецепторов в иммунопатогенез бронхиальной астмы. TLRs могут рассматриваться перспективными маркерами прогноза течения БА и в дальнейшем — возможными терапевтическими мишенями.

Список литературы / References

1. Богомильский М.Р., Свитич О.А., Ганковский В.А., Рахманова И.В. Особенности врожденного иммунитета у здоровых детей и у детей с гипертрофией аденоидных вегетаций // Вестник РГМУ, 2015. № 4. С. 24-27. [Bogomilsky M.R., Svitich O.A., Gankovskiy V.A., Rakhmanova I.V. Innate immunity features in healthy children and in children with adenoid hypertrophy. *Vestnik RGMU = Bulletin of Russian State Medical University*, 2015, no. 4, pp. 24-27. (In Russ.)]
2. Зайцева М.А., Брагвадзе Б.Г., Свитич О.А., Ганковская Л.В. Ассоциация полиморфных маркеров, локализованных в 5'-нетранслируемой области гена DEFB1 с бронхиальной астмой у детей // Вестник РГМУ, 2016. № 4. С. 43-47. [Zaitseva M.A., Bragvadze B.G., Svitich O.A., Gankovskaya L.V. Analysis of TLRs genes expression and defb1 polymorphisms association in children with bronchial asthma. *Vestnik RGMU = Bulletin of Russian State Medical University*, 2016, no. 4, pp. 43-47. (In Russ.)]
3. Ковальчук Л.В., Ганковская Л.В., Мешкова Р.Я. Клиническая иммунология и аллергология с основами общей иммунологии. М.: ГЕОТАР-Медиа, 2011. С. 148-165. [Kovalchuk L.V., Gankovskaya L.V., Meshkova R. Ya. Clinical immunology and allergology with the basics of general immunology]. Moscow: GEOTAR-Media, 2011, pp. 148-165. (In Russ.)]
4. Ковальчук Л.В., Свитич О.А., Ганковская Л.В., МIRONSHICHENKOVA A.M., Ганковский В.А. Роль TOLL-подобных рецепторов в патогенезе инфекционных заболеваний человека // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье», 2012. № 2. С. 147-153. [Kovalchuk L.V., Svitich O.A., Gankovskaya L.V., Mironchenko M.A., Gankovskaya V.A. The role of TOLL-like receptors in the pathogenesis of human infectious diseases. *Kurskiy nauchno-prakticheskiy vestnik «Chelovek i ego zdorovye» = Kurskiy Scientifically-Practical Bulletin «Person and His Health»*, 2012, no. 2, pp. 147-153. (In Russ.)]
5. Ковальчук Л.В., Хорева М.В., Никонова А.С. Распознающие рецепторы врожденного иммунитета (NLR, RLR и CLR) // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии, 2011. № 1. С. 93-100. [Kovalchuk L.V., Khoreva, M.V., Nikonova A.S. Recognition receptors of innate immunity (NLR, RLR and CLR). *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2011, no. 1, pp. 93-100. (In Russ.)]
6. Чучалин А.Г., Оспельникова Т.П., Осипова Г.Л. Роль респираторных инфекций в обострениях бронхиальной астмы // Пульмонология, 2007. № 5. С. 32-34. [Chuchalin A.G., Ospelnikova T.P., Osipova G.L. The role of respiratory infections in exacerbations of bronchial asthma. *Pul'monologiya = Pulmonology*, 2007, no. 5, pp. 32-34. (In Russ.)]
7. Bezemer G.F., Sagar S., van Bergenhenegouwen J., Georgiou N.A., Garssen J., Kraneveld A.D., Folkerts G. Dual role of Toll-like receptors in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Pharmacol. Rev.*, 2012, no. 64, pp. 337-358.
8. Cirillo I., Marseglia G., Klersy C., Ciprandi G. Allergic patients have more numerous and prolonged respiratory infections than nonallergic subjects. *Allergy*, 2007, Vol. 62, no. 9, pp. 1087-1090.
9. Crespo-Lessmann A., Mateus E., Vidal S., Ramos-Barbón D., Torrejón M., Giner J., Soto L., Juárez C., Plaza V. Expression of toll-like receptors 2 and 4 in subjects with asthma by total serum IgE level. *Respir. Res.*, 2016, no. 17, p. 41.
10. Diogenes S. Ferreira, Raquel Annoni, Luiz F.F. Silva, Monique Buttignol, Angela B.G. Santos, Maria C.R. Medeiros, Luciana N.S. Andrade, Ching Y. Yick, Peter J. Sterk, Jorge L.M. Sampaio, Marisa Dolhnikoff, Sally E. Wenzel, Thais Mauad. Toll-like receptors, 3 and 4 and thymic stromal lymphopoietin expression in fatal asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2012, Vol. 42, no. 10, pp. 1459-1471.
11. Gankovskii V., Svitich O., Gankovskaya L., Alekseeva A., Zaiceva M., Bragvadze B., Namazova-Baranova L. Association between a functional single nucleotide polymorphism in the DEFB-1 gene and risk of child asthma. *Community, Diversity, Vitality*, 2016, p. 44.
12. Khoreva M.V., Gankovskaya L.V., Latisheva T.V. Expression and functional analysis of toll-like receptor 4 on peripheral blood monocytes in asthmatic patients. *Proceedings Allergy & Immunophysiology: Innovate Technologies*, 2016, pp. 43-51.
13. Pace E., Di Sano C., Ferraro M., Bruno A., Caputo V., Gallina S., Gjomarkaj M. Budesonide increases TLR4 and TLR2 expression in Treg lymphocytes of allergic asthmatics. *Pulm. Pharmacol. Ther.*, 2015, no. 32, pp. 93-100.

14. Svitich O., Gankovskaya L., Namazova-Baranova L., Gankovskii V., Zaiceva M., Alekseeva A., Bragvadze B. Association of SNPS in DEFB1 gene and HBD-1 expression with bronchial asthma. *Allergy*, 2016, Vol. 71, no. S102, p. 280.

15. Tashiro H., Takahashi K., Hayashi S., Kato G., Kurata K., Kimura S., Sueoka-Aragane N. Interleukin-33 from Monocytes Recruited to the Lung Contributes to House Dust Mite-Induced Airway Inflammation in a Mouse Model. *PLoS One*, 2016, no. 11, pp. 1-16.

16. Wark P., Johnston S. Asthmatic bronchial epithelial cells have a deficient innate immune response to infection with rhinovirus. *The Journal of Experimental Medicine*, 2005, no. 6, pp. 937-947.

Авторы:

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

Намазова-Баранова Л.С. — д.м.н., профессор, академик РАН, заведующая кафедрой факультетской педиатрии № 1 ПФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; заместитель директора по научной работе, ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Хорева М.В. — д.м.н., профессор кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Брагвадзе Б.Г. — аспирант кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Огурцова А.Д. — аспирант кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Алексева А.А. — к.м.н., кафедра факультетской педиатрии № 1 ПФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; заведующая отделением восстановительного лечения детей с аллергическими болезнями и заболеваниями органов дыхания, ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Ганковский В.А. — к.м.н., врач-оториноларинголог отделения восстановительного лечения детей с болезнями ЛОР-органов и челюстно-лицевой области, ФГАУ «Национальный научно-практический центр здоровья детей» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Свитич О.А. — д.м.н., член-корр. РАН, доцент кафедры иммунологии МБФ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

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

Namazova-Baranova L.S., PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Pediatrics No. 1, Russian National N. Pirogov Research Medical University; Deputy-director on Science, National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Khoreva M.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Bragvadze B.G., Postgraduate Student, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Ogurtsova A.D., Postgraduate Student, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Alekseeva A.A., PhD (Medicine), Department of Pediatrics No. 1, Russian National N. Pirogov Research Medical University; Head of the Department of rehabilitation of children with allergic diseases and respiratory diseases, National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Gankovskii V.A., PhD (Medicine), The ENT specialist of the Department of rehabilitation treatment of children with diseases of ENT organs and oral and maxillofacial region, National Scientific and Practical Center of Children's Health, Moscow, Russian Federation

Svitich O.A., PhD, MD (Medicine), Corresponding Member, Russian Academy of Sciences, Assistant Professor, Department of Immunology, Medicobiologic Faculty, Russian National N. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 01.03.2017
Принята к печати 14.03.2017

Received 01.03.2017
Accepted 14.03.2017

КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОИЗВОДНОГО АДАМАНТАНА В ТЕРАПИИ АСТЕНИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ ПРИ РАННИХ ФОРМАХ ХРОНИЧЕСКОЙ ИШЕМИИ МОЗГА

Давыдова Е.В.¹, Зурочка А.В.^{2,3}

¹ ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

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

³ ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (Национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Резюме. Основным механизмом развития астенических расстройств у ветеранов современных войн с ранними формами хронической ишемии мозга после их возвращения к мирной жизни является неспецифическая стресс-индуцированная перегрузка эмоциогенных структур лимбико-ретикулярной системы в условиях дефицита эндогенных энергетических ресурсов. Обследовано 30 ветеранов Афганистана с ранними формами хронической ишемии мозга с проявлениями психогенного астенического синдрома. Курсовой прием производного адамантана в дозе 50 мг 2 раза в день при лечении психогенной астении у ветеранов современных войн приводит к реализации комплекса фармакологических эффектов: психостимулирующего, анксиолитического, вегетотропного, антигипотимического, гипнотического с редукцией основной психопатологической и соматоневрологической симптоматики. Установлено выраженное иммунотропное действие препарата, выраженное в виде: усиления процессов иммунопоэза; активации врожденных механизмов защиты; роста популяции Трег-лимфоцитов, свидетельствующего об усилении супрессорного влияния на механизмы аутоиммунной агрессии; реализации комитогенного и пролиферативного эффекта; антиапоптогенных свойств; противовоспалительного действия (снижения уровня TNF α , IL-8, hsCRP, роста IL-2) и связанного с ним снижения функциональной активности мононуклеаров; вазотропного действия в виде нормализации баланса вазоактивных факторов (оксида азота, эндотелина-1), снижения концентрации нитротирозина, свидетельствующего о редукции нитрозативного стресса. Актопротекторное действие препарата реализуется сочетанием психостимулирующего, вазотропного, пролиферативного эффектов и выражается в виде повышения работоспособности и оптимизации показателей системной гемодинамики.

Ключевые слова: хроническая ишемия мозга, астенический синдром, Ладастен, иммунотропное действие

CLINICAL AND IMMUNOLOGICAL EFFICIENCY OF ADAMANTANE DERIVATIVE IN THERAPY OF ASTHENIC DISORDERS IN EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA

Davydova E.V.^a, Zurochka A.V.^{b,c}

^a South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

^b Research Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg, Russian Federation

^c South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Abstract. A non-specific stress-induced overload of limbic-reticular emotiogenic structures under the deficiency conditions of endogenous energy resources is the main mechanism for development of asthenic

Адрес для переписки:

Давыдова Евгения Валерьевна
ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет»
454092, Россия, г. Челябинск, ул. Воровского, 64.
Тел.: 8 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Address for correspondence:

Davydova Evgenia V.
South Ural State Medical University
454092, Russian Federation, Chelyabinsk, Vorovskogo str., 64.
Phone: 7 (908) 060-92-06.
E-mail: dav-zhenya@yandex.ru

Образец цитирования:

Е.В. Давыдова, А.В. Зурочка «Клинико-иммунологическая эффективность производного адамантана в терапии астенических расстройств при ранних формах хронической ишемии мозга» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 441–452. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-441-452
© Давыдова Е.В., Зурочка А.В., 2017

For citation:

E.V. Davydova, A.V. Zurochka "Clinical and immunological efficiency of Adamantane derivative in therapy of asthenic disorders in early forms of chronic brain ischemia", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 441–452. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-441-452
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-441-452

disorders with early developing chronic brain ischemia among veterans of recent wars, upon their return to civilian life. We observed a group of 30 Afghan veterans with early forms of chronic brain ischemia and manifestations of psychogenic asthenic syndrome. When treating psychogenic asthenic syndrome in the veterans of recent military conflicts, an adamantane derivative administered as a course treatment, at a dose of 50 mg 2 times daily causes psychostimulant, anxiolytic, vegetotropic, antihypotymic, and hypnotic pharmacological effects, with reduction of main psychopathological and somatoneurological symptoms.

A notable immunotropic effect of the drug was revealed, being expressed as enhanced immunopoiesis; activation of innate defense mechanisms; expansion of Treg lymphocyte population, suggestive for increased suppressor effect upon the mechanisms of autoimmune aggression; implementation of cell differentiation/proliferative effect; anti-apoptogenic properties; anti-inflammatory activity (reduction of TNF α , IL-8, hsCRP, along with IL-2 increase) associated with reduced functional activity of mononuclear cells; vasotropic action expressed as normalized balance of vasoactive factors (nitric oxide, endothelin-1), decrease of nitrotyrosine concentration, suggesting the nitrosylation stress reduction. The actoprotective drug effect is implemented due to a combined psychostimulant, vasotropic, proliferative effects. It may be expressed in terms of higher efficiency and optimization of systemic hemodynamic parameters.

Keywords: chronic brain ischemia, asthenic syndrome, Ladasten, immunotropic action

Введение

Астенический синдром является ядром клинической картины ранних форм хронической ишемии мозга (ХИМ), к которой относятся начальные проявления недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ) и проявляется спонтанной слабостью, истощаемостью при минимальной умственной нагрузке, длительно продолжающейся и не проходящей после отдыха, раздражительностью, пониженным настроением, тревожностью, эмоциональной лабильностью, головной болью, бессонницей, повышенной утомляемостью, многочисленными вегетативными расстройствами. В понимании механизмов развития астенических расстройств у ветеранов современных войн с НПНКМ особая роль принадлежит неспецифической стресс-индуцированной перегрузке и дезорганизации эмоциогенных структур лимбико-ретикулярной системы в условиях дефицита эндогенных энергетических ресурсов. В основе формирования НПНКМ, как проявления дезадаптационных астено-вегетативных, в дальнейшем и психосоматических расстройств у ветеранов после их возвращения к мирной жизни, лежит военный стресс, образуя установочную доминанту, являющуюся в дальнейшем функциональным очагом психической патологии.

Фармакологические препараты, используемые для коррекции астенических проявлений, преимущественно воздействуют на центральное звено астенического синдрома — повышенную истощаемость психических функций. Однако, с позиций интенсивно развивающейся в настоящее время науки нейроиммунологии, к основным регуляторным системам относятся не только общепризнанные нервная и эндокринная системы, но и иммунная, а медикаментозное воздействие на одну из составляющих систем влечет закономерные изменения остальных функциональных модулей.

Одним из наиболее эффективных современных препаратов для коррекции астении является производное адамантана N-(2-адамантил)-N-

(парабромфенил)-амин (препарат Ладастен®), обладающий сочетанным психостимулирующим, актопротекторным, анксиолитическим и иммуномодулирующим действием. В ряде исследований показано иммуностропное [3, 4, 6, 8] и актопротекторное [4, 6, 8] действие препарата.

Целью исследования явилась оценка клинико-иммунологической эффективности производного адамантана в лечении психогенных астенических проявлений при ранних формах хронической ишемии мозга.

Материалы и методы

Работа проводилась на базе Челябинского областного клинического терапевтического госпиталя для ветеранов войн. В исследование включено 30 участников войны в Афганистане с НПНКМ (средний возраст $46,99 \pm 2,48$). Верификация диагноза НПНКМ проведена в соответствии с классификацией Шмидта Е.В. (1985) [7] и на основании клинических и инструментальных методов исследования. Астенические расстройства наблюдались у всех пациентов основной группы с НПНКМ и составляли характерную клиническую картину. На протяжении 14 дней все пациенты с НПНКМ, включенные в исследование, получали монотерапию препаратом Ладастен (производное адамантана) в дозе 50 мг 2 раза в день. Курсовая доза 1,4 г. Забор венозной крови для исследования проводили до начала терапии Ладастеном (1 группа) и на 14 сутки приема препарата (2 группа). Контрольная группа (3) состояла из военнослужащих 24 мужчин того же возраста, условно здоровых, без проявлений НПНКМ (средний возраст $43 \pm 1,6$ года). Организация исследования одобрена этическим комитетом ГБОУ ВО ЮУГМУ (протокол № 11 от 9.11.2013 г). От всех больных получено информированное согласие на участие в исследовании.

Анкетирование, оценку клинического и нейropsychологического статуса проводили с фиксированной периодичностью регистрации состояния до начала терапии Ладастеном, на 7 и 14 сутки приема препарата. Для объективизации

эффективности терапии проводилось нейропсихологическое тестирование (опросник самооценки состояния САН, личностной и реактивной тревожности Спилберга–Ханина, госпитальной шкалы тревоги Гамильтона (HADS), визуально-аналоговой шкалы астенического состояния (CGI), с определением выраженности проявлений по 5-балльной рейтинговой шкале вербальных оценок. Регистрация побочных эффектов терапии оценивалась согласно структурированной скандинавской шкале оценки побочного действия (UKU) на протяжении всего курса терапии. Определялась также комплаентность к терапии.

Оценка иммунного статуса

Имунофенотипирование проводили методом проточной цитометрии на цитометре FC-500 (Beckman Coulter, США). Использованы двухпараметрические реагенты серии IOTest: CD3-FITC/CD19-PE/CD4-PE/CD8-PE/CD(16+56+)/CD25-PE/CD HLA-DR-PE/CD95-PE. Кроме основных популяций иммунных клеток, определяли субпопуляции В-лимфоцитов (B1 (CD19⁺CD5⁺), B2 (CD19⁺, CD5⁺), активированные В-лимфоциты (CD20⁺CD23⁺), Т-регуляторные клетки (CD4⁺CD25⁺CD127⁺).

Оценка апоптоза и цитокинов

Интенсивность процессов апоптоза оценивали путем флуориметрического (VersaFluor, Bio-Rad) определения активности каспаз 3 и 8/FLICE (BIOSOURCE). Результат выражали в относительных единицах флюоресценции (ОЕФ, Relative Fluorescent units, RFU). Количество цитокинов: TNF α (пг/мл), хемокина IL-8 (пг/мл), IL-2 (пг/мл) определяли методом ИФА с помощью тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (г. Новосибирск). Концентрацию высокочувствительного С-реактивного белка (hsCRP), мг/л, определяли тест-системой BioMedica (Австрия).

Оценка вазоактивных факторов

Проводилась по содержанию конечных метаболитов оксида азота нитритов (NO₂), нитратов (NO₃) и их суммарных продуктов (NO_x). Уровень стабильного конечного продукта окисления пероксинитрита-нитротирозина (нМ) с помощью тест-системы для ИФА (Nitrotyrosine, HBT). Уровень вазоконстриктора эндотелина-1 с помощью тест-системы BioMedica (Австрия), чувствительность тест-системы 0,02–10 фмоль/мл.

Выделение мононуклеаров

Для изучения фракции мононуклеаров кровь стабилизировали гепарином из расчета 10 ЕД/мл. Клетки выделяли на фиколл-верографин-градиенте плотностью 1,077 г/мл при центрифугировании (400 г 45 минут). Отмытые и ресуспендированные клетки доводили до концентрации 1×10^7 кл/мл. Жизнеспособность лимфоцитов оценивали путем окраски их 0,2 % трипановым синим, она составила не менее 98%.

Оценка адгезии мононуклеаров

Адгезивную способность мононуклеаров определяли путем их адгезии на пластик, подсчет

(%) производили в камере Горяева. Параллельно применялся спектрофотометрический метод определения адгезии мононуклеаров на пластик, фиксированный монослой клеток окрашивали по Романовскому–Гимзе, результат учитывали на спектрофотометре Multiscan Plus.

Оценка механизмов бактерицидности

Определение спонтанного и индуцированного НСТ- и МТТ-тестов проводили спектрофотометрическим методом. МТТ-тест основан на восстановлении бесцветной соли тетразолия митохондриальными и цитоплазматическими дегидрогеназами живых метаболически активных клеток с образованием голубых кристаллов формазана, количество которого измеряется спектрофотометрически, после растворения кристаллов в ДМСО. Мононуклеары инкубировали в 96-луночном плоскодонном планшете (200 мкл клеточной суспензии мононуклеаров, в концентрации 2×10^6 кл/мл в полной среде RPMI-1640) 44 ч с добавлением 50 мкл ЛПС *S. typhi* для стимуляции моноцитов, после чего в лунки вносили 3-4,5-диметилтиазол-2-ил-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-краситель) инкубировали 4 часа и оценивали спектрофотометрически. Результат учитывали на спектрофотометре Multiscan Plus при длине волны 560 нм. Индекс стимуляции рассчитывали по формуле ОП опыта / ОП контроля.

Оценка пролиферации фагоцитов

Пролиферативную активность мононуклеаров с флуориметрической оценкой результатов проводили в стерильных условиях, используя ламинарный бокс. В 96-луночные планшеты вносили по 200 мкл ресуспендированных в культуральной среде (RPMI 1640 Sigma с 10% фетальной телячьей сывороткой, 2 мМ L-глутамин Sigma и 40 мкг/мл гентамицина сульфата (АО «Биомед-препараты»), клетки инкубировали 4 суток при 37 °С, 5% CO₂. Далее к суспензии клеток добавляли витальный краситель AlamarBlue® (Invitrogen, USA) в количестве 20 мкл (10%). Флуоресценцию измеряли через 4 часа на флуориметре VersaFluor (Bio-Rad) при длине волны возбуждения 390 нм, эмиссии 620 нм и выражали в относительных единицах флуоресценции (ОЕФ, Relative Fluorescent units, RFU).

Статистическая обработка материала

Для статистической обработки материала использовали пакет прикладных программ Statistica for Windows vers. 6.0. фирмы StatSoft Inc. (США), с определением средней арифметической вариационного ряда (М) и ошибки средней арифметической (m). Достоверность различий оценивали согласно критериям непараметрической статистики (Колмогорова–Смирнова, U-test Mann–Whitney), статистически значимыми считались изменения при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

В процессе лечения Ладастеном у ветеранов отмечалась выраженная положительная динамика

ка жалоб и основной психопатологической и соматоневрологической симптоматики. Терапевтическое действие Ладастена уже на 7 сутки приема препарата проявлялось редукцией симптомов тревоги, эмоциональной лабильности, раздражительности (с 80 до 66,6%, $p < 0,01$), уменьшением числа пациентов с явлениями головной боли (с 90 до 60%, $p < 0,01$). Известно, что анксиолитическое действие Ладастена опосредовано модулирующим влиянием Ладастена на процессы ГАМК-ергической медиации: повышением сродства ГАМК к ГАМК-бензодиазепиновому хлор-ионоформному рецепторному комплексу и снижением уровня экспрессии гена-транспортера обратного захвата ГАМК (GABA tr: GAT1,3) [1, 5]. Более отчетливо психостимулирующее и анксиолитическое действие Ладастена проявилось на 14 сутки приема препарата: значительно уменьшилось количество пациентов, отмечающих явления слабости, апатии, быстрой физической и умственной утомляемости. В основе психостимулирующего эффекта препарата лежит тропность Ладастена к DRc D3-подтипу рецепторов дофамина стриатума, контролирующих высвобождение дофамина [2], а также увеличение экспрессии гена тирозингидроксилазы и соответствующего белка с накоплением дофамина в гипоталамусе, гиппокампе.

Антигипотимическое действие препарата зафиксировано на 7 сутки приема, с пиком выраженности к окончанию курсового приема (от 83,3 до 50%, $p = 0,02$) в виде повышения способности ситуационного контроля за своими поступками (ситуационно-мотивированный характер настроения), оживления позитивной мимики, снижения частоты эпизодов смены настроения. Гипнотический эффект Ладастена проявлялся улучшением процессов засыпания и пробуждения, качества ночного сна. Гипнотическое действие препарата может быть обусловлено повышением экспрессии генов регуляторного нейропептида гипокретина (орексина), участвующего в интеграции метаболических, эмоциональных и циркадианных регуляторных сигналов системы «сон-бодрствование» [2]. Вегетотропное действие препарата показано не только в виде редукции явлений головной боли, а также в виде снижения количества пациентов с жалобами на затуманенное зрение ($p = 0,05$), головокружение ($p = 0,05$), проявления гиперестезии ($p < 0,01$), потливости ($p = 0,005$), максимально выраженное на 14 сутки приема препарата. Положительно изменилась работоспособность ветеранов, рассматриваемая как проявление актопротекторного эффекта препарата. Не установлено, однако, отчетливого влияния на когнитивные функции пациентов (нарушения памяти, внимания). Отсутствовали также изменения в проявлениях метеозависимости. На уровне тенденции, не достигающей степени статистической достоверности, уменьшилось количество пациентов с жалобами на шум в ушах/голове.

Субъективная оценка выраженности астенической симптоматики по пятибалльной рейтинговой шкале после полного курса препарата показала отчетливое уменьшение выраженности головной боли (с 1,5 до 1,1 балла, $p = 0,01$), явлений сниженного настроения, т.е. качественное изменение (повышение, улучшение) симптома (с 2,1 до 1,5 баллов, $p = 0,01$), повышение работоспособности (с 1,2 до 1,8 баллов, $p = 0,001$), субъективное уменьшение проявлений слабости, утомляемости, тревоги, эмоциональной лабильности, раздражительности (с 2,5 до 1,4 баллов, $p = 0,001$). Качественно снизились и явления гиперестезии.

К 7 дню курсовой терапии Ладастеном отмечалось статистически достоверное повышение показателей «активности», субклинически выраженная тревога у части ветеранов с НПНКМ, согласно опроснику HADS, и реактивная тревожность нивелированы до показателей нормы, к 14 дню дополнительно значимо увеличились показатели «самочувствия», «настроения» (опросник САН), с редукцией показателя личностной тревожности. По данным исследования визуально-аналоговой шкалы астенического состояния (ШАС) средний балл до начала терапии Ладастеном соответствовал слабовыраженной астении, на 7 сутки лечения показал отсутствие признаков астении, более выраженное к 14 дню терапии.

Можно предполагать, что сочетание психостимулирующего, анксиолитического, вегетотропного и других эффектов препарата в совокупности дают выраженный кумулятивный антиастенический эффект, на что указывают показатели терапевтической эффективности по шкале общего клинического впечатления (CGI), согласно которым после курсового приема Ладастена «большое» и «очень большое» улучшение достигнуто у 26 пациентов (86,6%), у 3 пациентов (10%) отмечено «небольшое улучшение», а «отсутствие эффекта» отметил лишь 1 пациент (3,3%) с НПНКМ.

В процессе лечения некоторые пациенты отмечали возникновение побочных эффектов, не требовавших отмены препарата. В целом отмечена хорошая переносимость препарата, побочные явления установлены у 10 пациентов. Выраженность побочных эффектов в подавляющем большинстве случаев (80%) была незначительной, не оказывала существенного влияния на самочувствие больных и не требовала отмены препарата. Комплаентность к лечению была на достаточно высоком уровне, режим приема препарата выполнялся полностью, все пациенты закончили полный курс лечения.

Наличие иммуностропного эффекта Ладастена, преимущественно в отношении клеточного компартмента иммунной системы, описанного в ряде исследовательских работ, побудило к более глубокому анализу системного иммуностропного действия препарата. Методом проточной цитометрии изучены параметры популяционного и суб-

популяционного спектра Т- и В-лимфоцитов, минорные субпопуляции иммуноцитов, с определением количества клеток с маркерами позитивной и негативной активации, адгезивная активность моноклеаров, механизмы бактерицидности, пролиферативная способность иммуноцитов и влияние на механизмы апоптоза лимфоцитов до лечения, после курса терапии и в сравнении с контрольными значениями здоровых военнослужащих.

При изучении системного иммуотропного эффекта Ладастена установлен ряд изменений параметров клеточного компартмента иммунной системы (табл. 1).

Анализ таблицы 1 показал наличие роста в системной циркуляции лейкоцитов, Т-хелперов за счет интенсивности лейкопоза на уровне центральных органов иммуногенеза. Отмечено отсутствие роста общего числа Т-лимфоцитов, числа Т-цитотоксических клеток после курсового приема препарата, при этом отсутствие значимых различий с контрольной группой, позволяет констатировать нормализующие перераспределительные изменения в отношении субпопуляционного состава Т-лимфоцитов. Т-NK — малая субпопуляция NK-клеток, выполняющая, как киллинговую, так и регуляторную функции за счет активации цитолитических процессов, секреции хемокинов (CCL3, CCL4, XCL1) и цитокинов (GM-CSF, TNF α , IFN γ) после курсового приема препарата значимо выросла в сравнении со значениями до лечения в своем абсолютном значении и на уровне тенденции роста в относительном. Фенотип Т-NK-лимфоцитов позволяет отнести эти клетки также к врожденным механизмам иммунной защиты.

Известно, что NK-клетки являются наиболее чувствительной популяцией иммунных клеток к физиологическим и психологическим стрессам. После курса Ладастена абсолютные значения NK-лимфоцитов значимо выросли, максимально приближаясь к значениям контрольной группы, что отражает позитивное действие препарата на механизмы врожденной защиты организма.

Изучение количества лимфоцитов с маркерами ранней и поздней позитивной активации, показало после курсового приема препарата наличие роста в циркуляции относительного и абсолютного количества CD25⁺ позитивных лимфоцитов, готовых к реализации пролиферативного потенциала клетки, индуцируемого IL-2. Комитогенный эффект Ладастена экспериментально установлен в культуре Т-лимфоцитов и сопряжен с активацией конечных эффекторов МАП-киназного каскада — протеинкиназ ERK1/2 [3, 6]. Число лимфоцитов с маркерами поздней позитивной активации не претерпело значимых изменений.

Количественные изменения коснулись также достаточно гетерогенной Т-регуляторной субпопуляции лимфоцитов (табл. 2), абсолютное количество которых достоверно увеличилось после

приема Ладастена, что может свидетельствовать об усилении супрессорного влияния на механизмы аутоиммунной агрессии.

В случае приема Ладастена при НПНКМ рост количества Т-регуляторных клеток, отражает достоверно выраженный иммуотропный эффект, однако в условиях дизрегуляторных изменений, наблюдаемых при данной цереброваскулярной патологии, при адекватном функционировании ГЭБ, данный эффект отражает лишь события, происходящие на периферии. В случае прогрессии ранних форм ХИМ, при ДЭП-1, увеличение на фоне приема препарата Т-регуляторной популяции лимфоцитов позволило бы контролировать уровень аутоиммунного реагирования на проникновение мозговых антигенов в системную периферическую циркуляцию.

Относительное и абсолютное количество неактивированных (фенотип CD4⁺CD25⁻CD127⁺) и активированных (фенотип CD4⁺CD25⁺CD127⁺) Т-хелперов после лечения значимо не изменилось в сравнении с показателями до лечения и значений контрольной группы. Известно, что адаптерный продукт CD127⁺ (IL-7R) играет важную роль в пролиферации и дифференцировке зрелых Т-клеток [9].

Отмечены количественные изменения субпопуляции В-лимфоцитов (табл. 3).

Со стороны популяции В-лимфоцитов после приема Ладастена отмечен рост относительного числа общей популяции В-лимфоцитов, в сравнении с показателями до лечения и значениями контрольной группы; изменений абсолютного количества общей популяции В-клеток не зафиксировано. Отсутствовали достоверные различия в содержании клеток В1-субпопуляции лимфоцитов (CD5⁺), ассоциированной с продукцией аутоантител, а также числа активированных В-лимфоцитов (фенотип CD20⁺CD23⁺) до и после лечения. Численность субпопуляции В2-лимфоцитов (как относительное, так и абсолютное значение), негативной по CD5-маркеру и выполняющей роль трансмембранного регулятора передачи сигналов на BCR, имела устойчивую тенденцию к снижению и характеризовалась отсутствием различий с показателями контрольной группы, в отличие от параметров до приема Ладастена, значимо повышенных в сравнении с контролем.

Анализ динамики клеточных популяций с маркерами негативной активации и апоптоза лимфоцитов показал ряд изменений после приема Ладастена. После лечения снизилось количество клеток с показателями апоптоза, верифицированного морфологически в окраске Hoechst 33342, как относительного, так и абсолютного значений (табл. 4).

Количество лимфоцитов в абсолютном значении с маркерами готовности к апоптозу (CD95⁺) достоверно снизилось после лечения почти в 1,5 раза, что отражает снижение готовности лимфоцитов к реализации Fas-зависимого апоптоза.

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА СУБПОПУЛЯЦИОННОГО СПЕКТРА Т-ЛИМФОЦИТОВ И АКТИВАЦИОННЫХ МАРКЕРОВ В ДИНАМИКЕ ТЕРАПИИ ЛАДАСТЕНОМ (M±m)

TABLE 1. QUANTITATIVE ESTIMATION OF T-LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS AND ACTIVATION MARKERS IN THE DYNAMICS OF THERAPY BY LADASTEN (M±m)

Показатель Indicator	До приема препарата Ладастен (группа 1) Before taking Ladasten (Group 1) (n = 30)	После курса Ладастена (14 день) (группа 2) After a course Ladasten (14 day) (Group 2) (n = 30)	Контрольная (группа 3) Control (Group 3) (n = 24)	p Level of statistical reliability
Лейкоциты Leukocytes, 10 ⁹ /l	6,67±0,33	7,86±0,24	7,39±0,17	p ₁₋₂ = 0,001 p ₁₋₃ < 0,01
Лимфоциты Lymphocytes, %	34,5±1,9	33,4±1,0	32,5±0,7	
Лимфоциты Lymphocytes, 10 ⁹ /l	2,03±0,15	1,91±0,11	2,19±0,07	
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻) T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), %	74,5±0,9	75,5±0,9	74,6±0,7	
Т-лимфоциты (CD3⁺CD19⁻) T-lymphocytes (CD3 ⁺ CD19 ⁻), abs	1949,7±94,2	1896,8±144,1	1661,1±42,5	p ₁₋₃ = 0,03
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) T-helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺), %	35,6±0,8	38,2±1,2	38,9±0,6	p ₁₋₃ = 0,01
Т-хелперы (CD3⁺CD4⁺) T-helpers (CD3 ⁺ CD4 ⁺), abs	878,9±46,8	1018,7±60,9	881,64±39,7	p ₁₋₂ = 0,001
Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺) T-cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), %	26,9±1,03	26,1±0,7	27,82±0,73	
Т-цитотоксические (CD3⁺CD8⁺) T-cytotoxic (CD3 ⁺ CD8 ⁺), abs	564,1±38,7	563,4±29,4	516,5±16,7	
Соотношение CD4⁺/CD8⁺ Ratio CD4 ⁺ /CD8 ⁺ , abs	1,5±0,08	1,62±0,08	1,64±0,05	
Т-NK-лимфоциты T-NK lymphocytes, %	1,84±0,12	2,04±0,12	1,92±0,08	
Т-NK-лимфоциты T-NK lymphocytes, abs	54,6±6,4	66,3±3,8	57,1±2,3	p ₁₋₂ = 0,04
NK-лимфоциты NK lymphocytes, %	7,75±0,18	7,05±0,33	6,63±0,05	p ₁₋₂ = 0,02 p ₁₋₃ < 0,01
NK-лимфоциты NK lymphocytes, abs	197,5±15,6	235,9±16,1	232,4±8,1	p ₁₋₃ = 0,05 p ₁₋₂ = 0,04
CD25⁺ лимфоциты CD25 ⁺ lymphocytes, %	11,03±0,7	11,4±0,9	10,0±0,32	
CD25⁺ лимфоциты CD25 ⁺ lymphocytes, abs	290,4±14,6	223,2±13,7	86,91±2,72	p ₁₋₃ < 0,01 p ₂₋₃ = 0,002 p ₁₋₂ < 0,01
HLA Dr⁺ лимфоциты HLA Dr ⁺ lymphocytes, %	5,17±0,29	4,9±0,35	5,07±0,15	
HLA Dr⁺ лимфоциты HLA Dr ⁺ lymphocytes, abs	137,7±8,4	137,1±11,3	135,9±5,5	

Примечание. Достоверность различий по группам получена с помощью U-критерия Манна–Уитни (p < 0,05). p₁₋₂ – различия статистически значимы для показателей больных 1 и 2 групп; p₁₋₃ – различия статистически значимы для показателей больных 1 и 3 групп; p₂₋₃ – различия статистически значимы для показателей больных 2 и 3 групп.

Note. The reliability of differences in groups was obtained using Mann–Whitney U test (p < 0.05). p₁₋₂, differences are statistically significant for patients 1 and 2 groups; p₁₋₃, differences are statistically significant for patients 1 and 3 groups; p₂₋₃, differences are statistically significant for the indicators of patients in groups 2 and 3.

Известно, что апоптоз может запускаться несколькими путями, внутренний путь зависит от концентрации Ca^{2+} , АФК, повреждения ДНК, внешний путь активации каспаз регулируется связыванием специфического лиганда с рецептором $\text{TNF}\alpha$. Изучение активности ключевых внутриклеточных ферментов апоптоза – иницирующей (каспаза 8) и эффекторной (каспаза 3) показало достоверное снижение активности каспазы 3 и каспазы 8 после приема препарата Ладастен, что, наряду со снижением числа CD95^+ лимфоцитов, уровня проапоптогенного цитокина ($\text{TNF}\alpha$) и его растворимого лиганда (FasL), может лежать в основе антиапоптогенного, противовоспалительного и иммунопротекторного эффекта препарата. Антиапоптогенные свойства Ладастена установлены также в экспериментальном исследовании и связаны с его способностью снижать чувствительность Т-лимфоцитов к Fas-индуцированному апоптозу [3, 6]. В данном случае действие Ладастена, вероятно, направлено

как на пути регуляции внутриклеточного кальция, так и на снижение интенсивности внешнего сигналинга на активность ключевой исполнительской каспазы 3. Каспаза 3 имеет большое значение в условиях ишемии головного мозга и ее фармакологическое ингибирование является нейропротективным механизмом, следовательно, данный нейропротективный эффект Ладастена может быть использован при лечении хронической ишемии мозга, а также острых эпизодов цереброваскулярной патологии.

Характер изменения цитокинергической регуляции на фоне приема Ладастена показал выраженное снижение провоспалительного потенциала сыворотки крови в виде достоверного уменьшения уровня высокочувствительного С-реактивного белка (hs-CRP) (до лечения $2,2 \pm 0,09$; на 14 сутки курса $0,89 \pm 0,1$; в группе контроля $1,1 \pm 0,08$; $p_{1-2, 1-3} < 0,01$), хемокинов (IL-8) (до лечения $9,3 \pm 0,49$ пг/мл; на 14 сутки $7,4 \pm 0,5$ пг/мл; в группе контроля $8,4 \pm 0,24$ пг/мл;

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВЕННАЯ ОЦЕНКА ПОПУЛЯЦИИ Т-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК НА ФОНЕ ТЕРАПИИ ЛАДАСТЕНОМ ($M \pm m$)

TABLE 2. QUANTITATIVE ASSESSMENT OF THE POPULATION OF T-REGULATORY CELLS ON THE BACKGROUND OF LADASTEN THERAPY ($M \pm m$)

Показатель Indicator	До приема препарата Ладастен (группа 1) Before taking Ladasten (Group 1) (n = 30)	После курса Ладастена (14 день) (группа 2) After a course Ladasten (14 day) (Group 2) (n = 30)	Контрольная (группа 3) Control (Group 3) (n = 24)	p Level of statistical reliability
Т-регуляторные клетки ($\text{CD45R0}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^-$) T-regulatory cells ($\text{CD45R0}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^-$), %	$3,1 \pm 0,3$	$2,6 \pm 0,15$	$2,28 \pm 0,02$	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} < 0,01$
Т-регуляторные клетки ($\text{CD45R0}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^-$) T-regulatory cells ($\text{CD45R0}^+\text{CD4}^+\text{CD25}^{\text{high}}\text{CD127}^-$), abs	$57,8 \pm 8,2$	$81,16 \pm 8,1$	$47,4 \pm 1,7$	$p_{1-2} = 0,001$ $p_{2-3} = 0,001$
Т-хелперы неактивированные ($\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD127}^+$) Non-activated T-helpers ($\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD127}^+$), %	$76,3 \pm 11,7$	$85,1 \pm 12,6$	$90,5 \pm 11,0$	
Т-хелперы неактивированные ($\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD127}^+$) Non-activated T-helpers ($\text{CD4}^+\text{CD25}^-\text{CD127}^+$), abs	$1936,0 \pm 107,9$	$1677,4 \pm 153,4$	$1605,4 \pm 60,0$	
Т-хелперы активированные ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^+$) T-helpers activated ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^+$), %	$2,09 \pm 0,19$	$2,16 \pm 0,10$	$2,34 \pm 0,05$	
Т-хелперы активированные ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^+$) T-helpers activated ($\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{CD127}^+$), abs	$53,4 \pm 6,1$	$54,3 \pm 5,0$	$50,0 \pm 6,0$	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

$p_{1-2} < 0,01$), TNF α и роста регуляторного цитокина IL-2 после окончания курса терапии.

Уровень регуляторного IL-2 после курсового лечения Ладастеном значимо вырос в сравнении со значениями до лечения и контрольной группой (до лечения $21,3 \pm 1,0$ пг/мл; на 14 день терапии $27,7 \pm 1,8$ пг/мл; контрольная группа $18,3 \pm 1,9$ пг/мл; $p_{1-2} < 0,01$, $p_{1-3} < 0,01$).

В процессе лечения изменились также параметры функционального состояния моноцитов, кислородзависимых механизмов бактерицидности, пролиферативной активности клеток (табл. 5).

Как видно из таблицы 5, в группе пациентов с НПНКМ, как до лечения Ладастеном, так и после, относительное и абсолютное количество моноцитов крови достоверно отличалось от контрольной группы, следовательно, препарат не оказывал воздействия на моноцитопоз. Показатель адгезии мононуклеаров на пластик

у пациентов с НПНКМ после лечения имел тенденцию к снижению до показателей контрольной группы, что значимо отразилось в спектрофотометрическом варианте оценки теста, при этом показатели оптической плотности после лечения достоверно снизились относительно параметров до лечения и не отличались от контрольной группы, что, в том числе, является следствием редукции провоспалительного потенциала крови.

Для оценки влияния Ладастена на процессы кислородзависимого киллинга нами изучена МТТ — активность мононуклеаров. Показано, что моноциты больных с НПНКМ как в спонтанной, так и, в меньшей степени, в индуцированной ЛПС *S. typhi* МТТ пробе после лечения характеризуются достоверным снижением показателей в сравнении со значениями до лечения, что отражает уменьшение интенсивности внутриклеточной продукции активных форм кисло-

ТАБЛИЦА 3. СОДЕРЖАНИЕ В-ЛИМФОЦИТОВ И ИХ СУБПОПУЛЯЦИЙ В ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ПАЦИЕНТОВ С РАННИМИ ФОРМАМИ ХИМ ($M \pm m$)

TABLE 3. CONTENTS OF B-LYMPHOCYTES AND THEIR SUBPOPULATIONS IN PERIPHERAL BLOOD IN PATIENTS WITH EARLY FORMS OF CHRONIC BRAIN ISCHEMIA ($M \pm m$)

Показатель Indicator	До приема препарата Ладастен (группа 1) Before taking Ladasten (Group 1) (n = 30)	После курса Ладастена (14 день) (группа 2) After a course Ladasten (14 day) (Group 2) (n = 30)	Контрольная (группа 3) Control (Group 3) (n = 24)	p Level of statistical reliability
В-лимфоциты (CD19⁺) B-lymphocytes (CD19 ⁺), %	12,1 $\pm$ 0,4	13,6 $\pm$ 0,6	11,8 $\pm$ 0,3	$p_{1-2} = 0,03$ $p_{2-3} < 0,01$
В-лимфоциты (CD19⁺) B-lymphocytes (CD19 ⁺), abs	313,3 $\pm$ 28,1	310,7 $\pm$ 20,6	316,3 $\pm$ 10,4	
В1-лимфоциты (CD19⁺CD5⁺) B1-lymphocytes (CD19 ⁺ CD5 ⁺), %	0,36 $\pm$ 0,02	0,40 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,03	
В1-лимфоциты (CD19⁺CD5⁺) B1-lymphocytes (CD19 ⁺ CD5 ⁺), abs	14,8 $\pm$ 1,62	14,8 $\pm$ 1,57	17,5 $\pm$ 1,14	
В2-лимфоциты (CD19⁺CD5⁻) B2-lymphocytes (CD19 ⁺ CD5 ⁻), %	10,8 $\pm$ 0,98	9,95 $\pm$ 0,85	8,11 $\pm$ 0,37	$p_{1-3} = 0,009$
В2-лимфоциты (CD19⁺CD5⁻) B2-lymphocytes (CD19 ⁺ CD5 ⁻), abs	215,3 $\pm$ 27,9	200,6 $\pm$ 34,7	141,2 $\pm$ 9,0	$p_{1-3} = 0,02$
В-лимфоциты активированные (CD20⁺CD23⁺) B-lymphocytes activated (CD20 ⁺ CD23 ⁺), %	4,6 $\pm$ 0,4	4,9 $\pm$ 0,4	4,2 $\pm$ 0,2	
В-лимфоциты активированные (CD20⁺CD23⁺) B-lymphocytes activated (CD20 ⁺ CD23 ⁺), abs	142,7 $\pm$ 7,9	124,6 $\pm$ 12,4	114,3 $\pm$ 7,7	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

рода и является следствием снижения флогогенного профиля сыворотки крови.

Пролиферация, как и апоптоз, отражает проявления активации иммунокомпетентных клеток, при этом в первом случае активация носит «позитивный» характер, а во втором «негативный». Индикатором клеточной жизнеспособности является метаболическая и пролиферативная активность клетки, измеряемая с помощью Alamar Blue-теста. Активный компонент индикатора резазурин нетоксичен для клетки, легко проникает через неповрежденную мембрану, активно флуоресцирует, формируя количественный сигнал. Изучение пролиферативной активности мононуклеаров после приема Ладастена показало достоверное увеличение показателя флуоресценции и метаболической активности (RFU), что свидетельствует о высоком пролиферативном потенциале клеток, отражает комитогенную способность Ладастена и, вероятно, лежит в основе актопротекторного эффекта. Пролиферативное действие препарата может быть обусловлено, во-первых – его антиапоптогенным действием, во-вторых – снижением провоспалительного профиля крови, а также ростом в циркуляции IL-2, выполняющего роль росткового фактора для Т-лимфоцитов, в-третьих – абсолютным увеличением количества лимфоцитов с рецеп-

торами к IL-2 (CD25⁺ позитивных лимфоцитов. В ряде экспериментальных работ показано, что Ладастен при однократном внутривенном введении в дозе 50 мг/кг в клетках головного мозга крыс фосфорилирует мембранные белки и активирует протеинкиназы цАМФ, Ca²⁺ и МАП-киназных сигнальных каскадов [8] и может играть особую роль в реализации механизмов ишемической толерантности.

Важное значение в поддержании результирующего уровня локального сосудистого сопротивления имеет баланс вазоактивных факторов. Одним из наиболее мощных вазоконстрикторов, синтезируемых эндотелием, является эндотелин-1 (ЭТ-1), напротив, понижение тонуса гладкомышечных клеток в основном вызывает эндотелиальный фактор релаксации – оксид азота (NO), экспрессия которого зависит от концентрации внутриклеточного Ca²⁺ (табл. 6).

Концентрация конечных стабильных метаболитов оксида азота (общая продукция, нитраты и нитриты) в сыворотке до и после терапии Ладастеном имеет выраженную тенденцию к снижению, до показателей контрольной группы, что свидетельствует о нормализующем действии препарата в отношении продукции оксида азота и способствует нормализации сосудистого тонуса. Высокие концентрации нитротирозина

ТАБЛИЦА 4. ОСОБЕННОСТИ НЕГАТИВНОЙ АКТИВАЦИИ И АПОПТОЗА ЛИМФОЦИТОВ У ПАЦИЕНТОВ С НПКМ ДО И ПОСЛЕ ПРИЕМА ЛАДАСТЕНА (M±m)

TABLE 4. FEATURES OF NEGATIVE ACTIVATION AND APOPTOSIS OF LYMPHOCYTES IN PATIENTS WITH BEFORE AND AFTER ADMINISTRATION OF LADASTEN (M±m)

Показатель Indicator		До приема препарата Ладастен (группа 1) Before taking Ladasten (Group 1) (n = 30)	После курса Ладастена (14 день) (группа 2) After a course Ladasten (14 day) (Group 2) (n = 30)	Контрольная (группа 3) Control (Group 3) (n = 24)	p Level of statistical reliability
Апоптоз, верифицированный в окраске Hoechst 33342 Apoptosis verified Hoechst 33342 staining	%	6,3±0,3	4,3±0,4	4,3±0,2	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01 p ₂₋₃ < 0,01
	abs	0,46±0,1	0,15±0,02	0,14±0,02	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01
Casp 3, RFU		113,9±3,9	106,5±3,1	94,1±2,95	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01
Casp 8, RFU		424,7±52,2	230,1±26,5	258,9±28,9	p ₁₋₂ = 0,01 p ₁₋₃ = 0,02 p ₂₋₃ = 0,006
CD95⁺ лимфоциты CD95 ⁺ lymphocytes, %		15,6±0,56	14,9±0,55	15,2±0,46	
CD95⁺ лимфоциты CD95 ⁺ lymphocytes, abs		332,1±31,9	234,61±11,5	218,3±11,8	p ₁₋₂ = 0,01 p ₂₋₃ < 0,01
TNFα, pg/mL		2,1±0,2	1,5±0,1	1,34±0,04	p ₁₋₂ = 0,01 p ₁₋₃ = 0,01
FasL, pg/ml		0,46±0,06	0,18±0,02	0,21±0,01	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

плазмы — стабильного конечного продукта нитрирования ароматического кольца тирозина при НПНКМ до лечения свидетельствуют о наличии оксидативного (нитрозативного) клеточного стресса. Кроме того, следствием окисления пероксинитритом NH- и SH-групп белков является инактивация Mn-, Fe-супероксиддисмутаза, глутатиона, тканевых ингибиторов металлопротеиназ, что закономерно сопровождается снижением антиоксидантного потенциала клеток на территории ЦНС. На 14 сутки приема препарата уровень нитротирозина достоверно снизился, не достигая, однако, значений контрольной группы, что отражает редукцию выраженности оксидативного стресса на фоне приема Ладастена, способствует восстановлению антиоксидантного потенциала клеток и лежит в основе актопротекторного эффекта препарата.

Исследование вазоконстрикторной функции эндотелия до начала терапии Ладастеном показало значимое (в 1,4 раза) повышение концен-

трации ЭТ-1 в группе до лечения в сравнении с группой контроля и его снижение после курса терапии в 1,7 раз, что в совокупности с другими факторами позитивно отражается на показателях системной гемодинамики.

Показатели системной гемодинамики (САД, ДАД, ЧСС) оценивали по результатам сфигмоманометрии (табл. 7). Оценку статуса вегетативной нервной системы проводили по индексу Кердо, отражающему вегетативное обеспечение гемодинамических параметров. Индекс Кердо, равный нулю, характеризует вегетативное равновесие (эйтонию), отрицательные значения индекса Кердо указывают на преобладание парасимпатических влияний (ваготонию), значения больше нуля свидетельствуют о преобладании симпатических влияний (симпатикотонию).

После лечения отмечена стабилизация показателей системной гемодинамики в виде снижения САД, ДАД, АД и ЧСС в сравнении с параметрами, полученными до лечения, и отсутствия

ТАБЛИЦА 5. ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МОНОНУКЛЕАРОВ КРОВИ ВЕТЕРАНОВ С НПНКМ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ЛАДАСТЕНОМ

TABLE 5. FUNCTIONAL CHARACTERISTICS OF MONONUCLEAR BLOOD CELLS FROM VETERANS WITH AFTER TREATMENT WITH LADASTEN

Показатель Indicator	До приема препарата Ладастен (группа 1) Before taking Ladasten (Group 1) (n = 30)	После курса Ладастена (14 день) (группа 2) After a course Ladasten (14 day) (Group 2) (n = 30)	Контрольная (группа 3) Control (Group 3) (n = 24)	p Level of statistical reliability
	M±m	M±m	M±m	
Моноциты Monocytes, %	8,56±0,40	8,43±0,2	6,08±0,23	p ₁₋₃ = 0,02 p ₂₋₃ = 0,03
Моноциты Monocytes, 10 ⁹ /л	0,55±0,02	0,43±0,4	0,39±0,23	p ₁₋₃ = 0,025 p ₂₋₃ = 0,01
% адгезии на пластик (визуальная оценка) % adhesion to plastic (visual assessment)	67,3±1,79	63,4±0,3	59,8±3,11	
Адгезия (спектрофотометрическая оценка), в единицах оптической плотности Adhesion (spectrophotometric evaluation), OD units	0,38±0,04	0,20±0,05	0,20±0,03	p ₁₋₃ = 0,027 p ₁₋₂ = 0,01
Спонтанная МТТ-активность Spontaneous MTT activity	0,12±0,02	0,03±0,02	0,03±0,04	p ₁₋₃ = 0,01 p ₁₋₂ = 0,01
Стимулированная МТТ-активность Stimulated MTT activity	0,36±0,06	0,18±0,02	0,14±0,04	p ₁₋₃ = 0,004 p ₁₋₂ = 0,02
Индекс стимуляции МТТ The stimulation index of MTT	2,8±0,07	3,3±0,05	5,27±0,03	p ₁₋₃ = 0,003
Пролиферативная активность мононуклеаров, АВ-тест, RFU Proliferative activity of mononuclear cells, AV test, RFU	10777,2±880,1	11836,6±336,9	9932,3±355,1	p ₂₋₃ < 0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

ТАБЛИЦА 6. УРОВНИ ВАЗОАКТИВНЫХ ФАКТОРОВ НА ФОНЕ ЛЕЧЕНИЯ ЛАДАСТЕНОМ (M±m)

TABLE 6. LEVELS OF VASOACTIVE FACTORS IN THE BACKGROUND OF TREATMENT WITH LADASTEN (M±m)

Показатель Indicator	До приема препарата Ладастен (группа 1) Before taking Ladasten (Group 1) (n = 30)	После курса Ладастена (14 день) (группа 2) After a course Ladasten (14 day) (Group 2) (n = 30)	Контрольная (группа 3) Control (Group 3) (n = 24)	p Level of statistical reliability
Суммарная концентрация дериватов оксида азота (NOx), ммоль/л The total concentration of nitric oxide derivatives (NOx), Mmol/l	37,3±7,1	30,9±2,7	31,9±2,8	
Концентрация нитритов (NO ₂), ммоль/л Concentration of nitrites (NO ₂), Mmol/l	9,6±0,89	9,1±1,1	10,1±0,45	
Концентрация нитратов (NO ₃), ммоль/л Concentration of nitrates (NO ₃), Mmol/l	27,7±6,7	21,8±3,1	21,8±2,8	
Нитротирозин (Nt), нМ Nitrotyrosine (Nt), nM	3,2±0,2	2,4±0,18	1,0±0,05	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01 p ₂₋₃ < 0,01
Эндотелин-1 (ЭТ-1), фмоль/мл Endothelin-1 (ET-1), Fmol/ml	1,9±0,26	1,09±0,09	1,4±0,09	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

ТАБЛИЦА 7. ПОКАЗАТЕЛИ ЦЕНТРАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИКИ ПОСЛЕ ЛЕЧЕНИЯ ЛАДАСТЕНОМ

TABLE 7. INDICES OF CENTRAL HEMODYNAMICS AFTER TREATMENT WITH LADASTEN

Показатель Indicator	До приема препарата Ладастен (группа 1) Before taking Ladasten (Group 1) (n = 30)	После курса Ладастена (14 день) (группа 2) After a course Ladasten (14 day) (Group 2) (n = 30)	Контрольная (группа 3) Control (Group 3) (n = 24)	p Level of statistical reliability
	M±m	M±m	M±m	
Систолическое АД, мм рт. ст. Systolic BP, mmHg	137,7±2,4	122,1±2,9	120,4±2,17	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01
Диастолическое АД, мм рт. ст. Diastolic blood pressure, mmHg	81,4±1,9	75,0±1,3	68,9±1,5	p ₁₋₂ = 0,01 p ₁₋₃ < 0,01 p ₂₋₃ < 0,01
Пульсовое АД, мм рт. ст. Pulse BP, mmHg	56,3±2,7	47,8±3,03	51,5±2,5	p ₁₋₂ = 0,05
ЧСС, уд/мин Heart rate, bpm	74,8±1,8	68,0±1,4	66,3±1,06	p ₁₋₂ < 0,01 p ₁₋₃ < 0,01
Индекс Кердо The Kerdo Index	-9,4±3,1	-10,7±2,5	-4,4±2,6	

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

значимых различий с контрольной группой здоровых военнослужащих. В группе здоровых мужчин в покое показания индекса Кердо отражали состояние вегетативной НС, близкое к эйтонии, при НПНКМ наблюдалось усиление парасимпатических влияний, более выраженное после терапии Ладастеном, что на фоне снижения системного АД отражает стабилизацию состояния центральной гемодинамики.

В целом механизм действия Ладастена на показатели астении, в виде реализации психостимулирующего, анксиолитического, антигипотимического, гипнотического, вегетотропного, актопротекторного, вазотропного эффектов препарата, а также прямое и опосредованное действие на показатели иммунной системы, минимум побочных эффектов позволяет рекомендовать его в качестве препарата выбора для лечения астенических проявлений ранних форм ХИМ.

Список литературы / References

1. Аведисова А.С. Антиастенические препараты как терапия первого выбора при астенических расстройствах // Русский медицинский журнал, 2004. Т. 12, № 22. С. 1290. [Avedisova A.S. Anti-asthenic drugs as a first-line therapy in asthenic disorders. *Russkiy meditsinskiy zhurnal = Russian Medical Journal*, 2004, Vol. 12, no. 22, p. 1290. (In Russ.)]
2. Булатова Г.Р., Новикова Л.Б., Науширванов О.Р., Нигматуллин Р.Х. Характеристика психовегетативного синдрома и его медикаментозная коррекция у сотрудников правоохранительных органов // Вестник современной клинической медицины, 2015. Т. 8, № 6. С. 9-14. [Bulatova G.R., Novikova L.B., Naushirvanov O.R., Nigmatullin R.Kh. Characteristics of psycho-vegetative syndrome and drug correction of law enforcement officers. *Vestnik sovremennoy klinicheskoy meditsiny = Journal of Modern Clinical Medicine*, 2015, Vol. 8, no. 6, pp. 9-14. (In Russ.)]
3. Вахитова Ю.В., Садовников С.В., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Деметилирование остатков цитозина в промоторной области гена тирозингидроксилазы в клетках головного мозга крыс под действием производного аминадамантана – ладастена // Генетика, 2006. Т. 42, № 7. С. 968-975. [Vakhitova Yu.V., Sadovnikov S.V., Yamidanov R.S., Seredenin S.B. De-methylation of cytosine residues in the tyrosine hydroxylase promoter region of the gene in brain cells of rats under the action of aminoadamantane derivative – Ladasten. *Genetika = Genetics*, 2006, Vol. 42, no. 7, pp. 968-975. (In Russ.)]
4. Вахитова Ю.В., Ямиданов Р.С., Середенин С.Б. Ладастен индуцирует экспрессию генов, регулирующих биосинтез дофамина в различных структурах мозга крыс // Экспериментальная и клиническая фармакология, 2004. Т. 67, № 4. С. 7-11. [Vakhitova Yu.V., Yamidanov R.S., Seredenin S.B. Ladasten induces the expression of genes governing the biosynthesis of dopamine in various structures of rat brain. *Eksperimentalnaya i klinicheskaya farmakologiya = Experimental and Clinical Pharmacology*, 2004, Vol. 67, no. 4, pp. 7-11. (In Russ.)]
5. Незнамов Г.Г., Сюняков С.А., Гришин С.А., Телешова Е.С., Бочкарев В.К., Ларкова М.А., Середенин С.Б. Ладастен – перспективное средство коррекции астенических нарушений, развивающихся в экстремальных условиях // Симпозиум, посвященный 75-летию ГосНИИИ ВМ «Боевой стресс: механизмы стресса в экстремальных условиях». М., 2005. С. 142-144. [Neznamov G.G., Syunyakov S.A., Grishin S.A., Teleshova E.S., Bochkarev V.K., Larkova M.A., Seredenin S.B. Ladasten – a promising means of correction of asthenic disorders developing in extreme conditions. Symposium dedicated to the 75th anniversary of the Research Institute of the VM «Combat stress: mechanisms of stress in extreme conditions.». Moscow, 2005, pp. 142-144.]
6. Сибиряк С.В., Курчатова Н.Н., Юсупова Р.Ш., Сибиряк Д.С., Ахматова Н.К., Бикмаева А.Р., Вахитова Ю.В. Оценка индуцированного анти-CD3мАт митогенеза и активности каспазы С, как способ характеристики реактивности Т-лимфоцитов в клинических и экспериментальных исследованиях // Российский иммунологический журнал, 2002. Т. 7, № 3. С. 265-267. [Sibiryak S.V., Kurchatova N.N., Yusupova R.Sh., Sibiryak D.S., Akhmatova N.K., Bikmaeva A.R., Vakhitova Yu.V. Evaluation of induced anti-SDZmAt mitogenesis and caspase C as a means of characterizing the reactivity of T lymphocytes in clinical and experimental studies. *Rossiyskiy immunologicheskii zhurnal = Russian Immunological Journal*, 2002, Vol. 7, no. 3, pp. 265-267. (In Russ.)]
7. Шмидт Е.В. Классификация сосудистых поражений головного и спинного мозга // Журнал невропатологии и психиатрии, 1985. № 9. С. 1281-1288. [Schmidt E.V. Classification of vascular lesions of the brain and spinal cord. *Zhurnal nevropatologii i psikhiatrii = Journal of Neuropathology and Psychiatry*, 1985, no. 9, pp. 1281-1288. (In Russ.)]
8. Naoki Otani, Hiroshi Nawashiro, Kimihiro Nagatani, Satoru Takeuchi, Hiroaki Kobayashi, Katsuji Shima. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Following Traumatic Brain Injury. *Neuroscience and Medicine*, 2001, Vol. 2, no. 3, pp. 208-216.
9. Zaunders J.J., Dyer W.B., Munier M.L., Ip S., Liu J., Amyes E., Rawlinson W., De Rose R., Kent S.J., Sullivan J.S., Cooper D.A., Kelleher A.D. CD127⁺CCR5⁺CD38⁺⁺⁺CD4⁺ Th1 effector cells are an early component of the primary immune response to vaccinia virus and precede development of interleukin-2⁺ memory CD4⁺ T cells. *J. Virol.*, 2006, Vol. 80, no. 20, pp. 10151-10161.

Авторы:

Давыдова Е.В. — к.м.н., доцент кафедры патофизиологии ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный медицинский университет», г. Челябинск, Россия

Зурочка А.В. — д.м.н., профессор, ведущий научный сотрудник ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, г. Екатеринбург; ФГАОУ ВО «Южно-Уральский государственный университет» (национальный исследовательский университет), г. Челябинск, Россия

Authors:

Davydova E.V., PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pathophysiology, South Ural State Medical University, Chelyabinsk, Russian Federation

Zurochka A.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Leading Research Associate, Research Institute of Immunology and Physiology, Ekaterinburg; South Ural State University (National Research University), Chelyabinsk, Russian Federation

Поступила 07.02.2017

Отправлена на доработку 10.02.2017

Принята к печати 22.02.2017

Received 07.02.2017

Revision received 10.02.2017

Accepted 22.02.2017

ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ НЕКОНТРОЛИРУЕМОГО ТЕЧЕНИЯ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ У ДЕТЕЙ

Смольникова М.В.^{1,2}, Смирнова С.В.^{1,2}, Ильенкова Н.А.²,
Коноплева О.С.^{1,2}

¹ ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН“» — обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера», г. Красноярск, Россия

² ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Резюме. Бронхиальная астма — распространенное хроническое аллергическое заболевание легких в детском возрасте. Поиск маркеров неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей — приоритетная задача в аллергологии. Цитокины выполняют регуляторную функцию в патогенезе атопической бронхиальной астмы, принимая участие в инициации, развитии, персистенции аллергического воспаления в дыхательных путях, формируя вариации течения болезни (остроту, тяжесть, частоту обострений). В работе изучены показатели клеточного и гуморального звеньев иммунитета, а также уровни некоторых провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в сыворотке периферической крови (IL-4, IL-10, IL-2 и TNF α) с целью определения маркеров неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей. В исследование включены дети европеоидного происхождения: 1 группа — больные среднетяжелой атопической бронхиальной астмой с контролируемым течением заболевания в течение последних 3 месяцев (n = 59), 2 группа — больные тяжелой/среднетяжелой атопической бронхиальной астмой с неконтролируемым течением заболевания в течение последних 3 месяцев (n = 51), 3 группа контроля — практически здоровые дети без признаков атопии (n = 33). Все дети, включенные в группу больных атопической бронхиальной астмой, регулярно получали моно/комбинированную базисную терапию в высоких/средних терапевтических дозах. При сравнительном анализе показателей клеточного звена иммунитета определено статистически значимо низкий уровень CD3⁺ лимфоцитов, а также низкий уровень относительного и абсолютного содержания CD4⁺ и CD8⁺ клеток в группе с неконтролируемым течением атопической бронхиальной астмы по сравнению с группой контролируемого течения болезни. При оценке концентрации цитокинов в сыворотке периферической крови у больных с контролируемым и неконтролируемым течением атопической бронхиальной астмы отмечался статистически значимо высокий уровень IL-2, IL-4 и IL-10 в сравнении с группой контроля. Установлено, что концентрация TNF α значимо выше в обеих группах больных атопической бронхиальной астмой и превышает в 2–3 раза уровень этого цитокина в группе контроля. При сравнении групп с различными уровнями контроля над течением заболевания, выявлено, что концентрация TNF α в группе больных неконтролируемой бронхиальной астмой статистически значимо выше, чем в группе с контролируемым течением заболевания. Таким

Адрес для переписки:

Смольникова Марина Викторовна
Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел./факс: 8 (391) 228-06-83.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Address for correspondence:

Smolnikova Marina V.
Scientific Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
Partizan Zeleznyak str., 3g.
Phone/Fax: 7 (391) 228-06-83.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Образец цитирования:

М.В. Смольникова, С.В. Смирнова, Н.А. Ильенкова, О.С. Коноплева «Иммунологические маркеры неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 453–460. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460
© Смольникова М.В. и соавт., 2017

For citation:

M.V. Smolnikova, S.V. Smirnova, N.A. Ilyenkova, O.S. Konopleva
“Immunological markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 453–460.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-453-460

образом, в качестве маркеров неконтролируемого течения атопической бронхиальной астмы у детей могут служить: низкий уровень общего количества Т-лимфоцитов в периферической крови и клеток с фенотипом CD4⁺, CD8⁺, гиперпродукция IgE, низкое содержание общего IgA и высокая концентрация TNFα в сыворотке периферической крови.

Ключевые слова: атопическая бронхиальная астма, контролируемая астма, неконтролируемая астма, цитокины, иммуноглобулины, маркер заболевания

IMMUNOLOGICAL MARKERS OF UNCONTROLLED ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA IN CHILDREN

Smolnikova M.V.^{a, b}, Smirnova S.V.^{a, b}, Ilyenkova N.A.^b, Konopleva O.S.^{a, b}

^a Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center "Krasnoyarsk Science Center", Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

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

Abstract. Bronchial asthma is a prevalent chronic allergic disease of lungs at early ages. A priority task in allergology is to search biological markers related to uncontrolled atopic bronchial asthma. Cytokines fulfill their distinct function in pathogenesis of atopic bronchial asthma, participating at the initiation, development and persistence of allergic inflammation in airways, causing different variations of clinical course of the disease (with respect to its acuteness, severity, frequency of exacerbations). The present work has studied indices of cellular and humoral links of immunity, as well as levels of some pro- and anti-inflammatory cytokines in peripheral blood serum (IL-4, IL-10, IL-2 and TNFα), aiming to determine potential markers of uncontrolled atopic bronchial asthma in children. A group of Caucasian (European) children was involved into the research: Cohort 1, moderate atopic bronchial asthma with controlled course during the last 3 months (n = 59); Cohort 2, severe/moderate-severe atopic bronchial asthma with uncontrolled course of the disease within last 3 months (n = 51), Cohort 3 – control, practically healthy children without signs of atopy (n = 33). All the children included in the group with atopic bronchial asthma underwent regular mono/combined basic therapy at high/intermediate therapeutic doses. We performed a comparative analysis of cell population indices reflecting certain cellular immunity links, and determined significantly lower levels of CD3⁺ lymphocytes, as well as decrease in relative and absolute contents of CD4⁺ and CD8⁺ cells in the cohort with uncontrolled course of atopic bronchial asthma, as compared with controlled-course cohort. When evaluating concentrations of cytokines in peripheral blood serum of the patients with controlled and uncontrolled atopic bronchial asthma, we revealed significantly higher levels of IL-2, IL-4, and IL-10, as compared to control group. It was found that TNFα concentration is considerably higher in both cohorts of the patients, being 2- to 3-fold higher than the levels of this cytokine in control group. When comparing the cohorts with different control of the disease course, we have found that TNFα concentration in the cohort with uncontrolled bronchial asthma is statistically higher than among children with controllable course of the disease. Hence, the following parameters may serve as potential markers of pediatric atopic bronchial asthma with uncontrolled course: low levels of total T lymphocyte numbers in peripheral blood, and decreased counts of CD4⁺, CD8⁺ cells; IgE hyperproduction; low contents of common IgA, and high concentration of TNFα in peripheral blood serum.

Keywords: atopic bronchial asthma, controlled asthma, uncontrolled asthma, cytokines, immunoglobulins, marker of the disease

Введение

Бронхиальная астма — распространенное хроническое воспалительное аллергическое заболевание органов дыхания в детском возрасте. Инвалидность среди детского населения при аллергических заболеваниях формируется преимущественно за счет бронхиальной астмы, поэтому приоритетной задачей является поиск методов прогноза развития тяжелой формы и неконтролируемого течения болезни [1, 2, 7, 17]. Бронхиальная астма представляет собой глобальную медико-социальную проблему, что диктует не-

обходимость дальнейшего изучения механизма формирования ее тяжелых форм и поиска методов достижения контроля над течением заболевания. Влияние экзогенных и эндогенных факторов на звенья патогенеза бронхиальной астмы активно изучается [10, 11, 15, 18, 23], однако многие этапы формирования и модификации течения заболевания все еще остаются спорными.

Наибольшее значение в детском возрасте имеет атопический (IgE-опосредованный) тип реагирования [5, 20]. Возможно, отсутствие адекватного контроля атопической бронхиальной астмы обусловлено особенностями эндогенной регуля-

ции межклеточных взаимодействий, осуществляемой цитокинами, в процессе формирования аллерген-специфического иммунного ответа.

Общепринятой считается теория, согласно которой atopические заболевания обусловлены нарушением регуляции в иммунной системе, связанной с активацией аллерген-специфических клонов Th2-типа [10, 14, 25]. Функциональная активность Th2-лимфоцитов связана с секретируемыми ими цитокинами, в частности IL-4 [2, 15, 21, 23]. Одним из главных биологических свойств IL-4 является его способность активировать пролиферацию и функциональную активность В-лимфоцитов. IL-4 стимулирует продукцию активированными В-лимфоцитами определенных типов антител – реагинов (IgE и IgG₄). Известно, что продукция В-клетками отдельных изотипов антител также находится под контролем Т-лимфоцитов и продуцируемых ими цитокинов [6, 16].

Помимо Th2-лимфоцитов активно изучается влияние Th1- и Treg-лимфоцитов на различные звенья аллерген-специфического воспаления и гиперреактивность бронхов при бронхиальной астме [6, 7]. Основным биологическим эффектом IL-2 является стимуляция клеточного деления Т-лимфоцитов, синтеза антител В-клетками, усиление продукции провоспалительных цитокинов, стимуляция фагоцитоза [2, 3, 12]. Показано, что при дефиците IL-2 наблюдается повышенное содержание иммуноглобулинов классов IgE и IgG₁ в сыворотке крови, что может косвенно свидетельствовать об активации Th2-лимфоцитов. В связи с этим существует гипотеза о нарушении баланса между Th-клонами из-за недостатка IL-2 [6, 12].

Фактор некроза опухоли-α (TNFα) выполняет ряд важнейших функций в период инициации воспаления, а также играет роль в хронизации воспалительного процесса, за счет повышения адгезии макрофагов [6, 11, 25]. В ряде исследований найдены корреляции уровня TNFα с тяжестью симптомов atopической бронхиальной астмы [10, 11]. Treg-клетки и синтезируемый ими IL-10 способны подавлять аллергический ответ. В ряде исследований показано, что сниженная продукция IL-10 ассоциирована с тяжелым течением бронхиальной астмы [18, 24, 25].

Необходимо отметить, что механизмов формирования неконтролируемого течения бронхиальной астмы не выявлено. Сохраняется необходимость дальнейшего изучения иммунопатогенеза бронхиальной астмы для выявления маркеров неконтролируемого течения заболевания у детей.

Цель исследования – изучить показатели гуморального и клеточного звеньев иммунитета, определить концентрацию провоспалительных

и противовоспалительных цитокинов у детей с контролируемым и неконтролируемым течением atopической бронхиальной астмы и определить иммунологические маркеры неконтролируемого течения заболевания.

Материалы и методы

В исследовании участвовали 143 ребенка европейского происхождения, на условиях добровольного информированного согласия родителей. Обследованы дети с верифицированным диагнозом atopической бронхиальной астмы (АБА, n = 110) и практически здоровые дети без признаков atopии в личном и семейном анамнезе (n = 33). В соответствии с поставленной целью выделены группы исследования детей: 1 группа – больные среднетяжелой atopической бронхиальной астмой с контролируемым течением заболевания (КАБА, n = 59, средний возраст 12,5±1,6 лет), 2 группа – больные тяжелой/среднетяжелой АБА с неконтролируемым течением заболевания (НАБА, n = 51, средний возраст 13,1±2,77 лет), 3 группа – практически здоровые дети без признаков atopии (контроль, n = 33, средний возраст 13,56±2,54 года). Все дети, включенные в группу больных АБА, в течение последних трех месяцев получали моно/комбинированную базисную терапию в высоких/средних терапевтических дозах.

Всем детям, больным АБА, проводилось общеклиническое обследование, содержащее оценку выраженности клинических симптомов заболевания за последние 3 месяца. Для определения уровня контроля АБА дети вместе с родителями отвечали на вопросы теста по контролю над астмой (АСТ™) [17]. Использованы методы специфической аллергологической диагностики: сбор аллергологического анамнеза и проведение скарификационных проб с неинфекционными аллергенами в группе КАБА, а в группе НАБА анализ этиологических факторов заболевания проведен ретроспективно по данным амбулаторных карт. Для оценки функции внешнего дыхания проводились: спирометрия, пикфлоуметрический тест на обратимость бронхиальной обструкции.

Иммунологическое обследование включало определение показателей клеточного звена иммунитета методом проточной цитометрии на аппарате FC-500 (Beckman Coulter, США). Гуморальное звено иммунитета оценивалось путем определения уровня иммуноглобулинов (IgA, IgM, IgG, IgE) в сыворотке крови с помощью твердофазного иммуноферментного анализа («Вектор-Бест», г. Новосибирск). Концентрация цитокинов (IL-2, IL-4, IL-10, TNFα) определялась с помощью твердофазного иммуноферментного анализа («Вектор-Бест», г. Новосибирск).

Статистическая обработка данных проведена с использованием программы Statistica 6.0. Для представления количественных данных, не подчиняющихся нормальному закону распределения, применялся непараметрический критерий U-test Манна-Уитни. Данные в таблицах и тексте представлены в виде медианы, 25 и 75 квартили (Me, $Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$). Критический уровень значимости, при проверке статистических гипотез о существовании различий

показателей между группами, p принят равным 0,05.

Результаты

В результате анализа популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов выявлено, что в группе НАБА по сравнению с группой КАБА отмечается статистически значимо ($p = 0,049$) низкое общее количество $CD3^+$ лимфоцитов (табл. 1). В группе с неконтролируемым течением

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ИММУННОГО СТАТУСА ПРИ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЕ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ КОНТРОЛЯ НАД ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ У ДЕТЕЙ, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 1. INDEXES OF IMMUNE STATUS IN BRONCHIAL ASTHMA DEPENDENT ON DIFFERENT LEVELS OF CONTROL OVER CLINICAL COURSE IN CHILDREN, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Показатели Indicators	Группа 1, (КАБА) Cohort 1, (CBA) n = 51	Группа 2, (НАБА) Cohort 2, (UBA) n = 59	Группа 3, (контроль) Cohort 3, (control) n = 33	Уровень значимости, p^* Achieved significance level, p^*
Лимфоциты (%) Lymphocytes (%)	38,0 (31,0; 44,0)	30,0 (25,0; 37,0)	37,0 (34,0; 39,0)	$p_{1,2} = 0,023$ $p_{1,3} = 0,086$ $p_{2,3} = 0,032$
$CD3^+$ (%)	38,0 (31,0; 44,0)	60,0 (54,0; 67,0)	65,0 (61,0; 68,0)	$p_{1,2} = 0,049$ $p_{1,3} = 0,025$ $p_{2,3} = 0,028$
$CD3^+$ (cells/ μ l)	1536 (1010; 1600)	695,5 (594,0; 1065,0)	1388 (1065; 1739)	$p_{1,2} = 0,014$ $p_{1,3} = 0,022$ $p_{2,3} = 0,0014$
$CD4^+$ (%)	34,0 (19,0; 40,0)	24,0 (18,0; 30,0)	37,0 (20,0; 30,0)	$p_{1,2} = 0,007$ $p_{1,3} = 0,0022$ $p_{2,3} = 0,0004$
$CD4^+$ (cells/ μ l)	490 (101; 707)	207 (146; 263)	754 (573; 964)	$p_{1,2} = 0,039$ $p_{1,3} = 0,0073$ $p_{2,3} = 0,001$
$CD8^+$ (%)	26,0 (21,0; 29,0)	38,0 (31,2; 42,0)	25,0 (21,0; 39,0)	$p_{1,2} = 0,038$ $p_{1,3} = 0,048$ $p_{2,3} = 0,0002$
$CD8^+$ (cells/ μ l)	316 (133; 531)	288 (211; 419)	402 (238; 533)	$p_{1,2} = 0,05$ $p_{1,3} = 0,123$ $p_{2,3} = 0,014$
$CD4^+/CD8^+$ ratio	1,3 (0,7; 1,9)	0,7 (0,49; 0,85)	1,8 (1,4; 2,7)	$p_{1,2} = 0,047$ $p_{1,3} = 0,0006$ $p_{2,3} = 0,0046$
IgA (g/L)	1,2 (0,9; 2,1)	1,6 (0,9; 2,5)	1,9 (0,7; 2,1)	$p_{1,2} = 0,075$ $p_{1,3} = 0,048$ $p_{2,3} = 0,06$
IgM (g/L)	1,2 (1,0; 1,3)	1,1 (1,0; 1,3)	1,2 (0,7; 1,9)	$p_{1,2} = 0,117$ $p_{1,3} = 0,42$ $p_{2,3} = 0,36$
IgG (g/L)	15,1 (11,8; 18,9)	12,6 (10,0; 17,7)	10,7 (8,2; 14,8)	$p_{1,2} = 0,113$ $p_{1,3} = 0,06$ $p_{2,3} = 0,11$
IgE (IU/mL)	128,0 (151; 296)	235,5 (169,9; 599,9)	31,13 (1,79; 49,5)	$p_{1,2} = 0,047$ $p_{1,3} < 0,001$ $p_{2,3} < 0,001$

Примечание. * – p – достоверность различий, критерий Манна–Уитни.

Note. * p , significance of differences, Mann–Whitney U-test.

ТАБЛИЦА 2. КОНЦЕНТРАЦИЯ ЦИТОКИНОВ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ ДЕТЕЙ, БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ КОНТРОЛЯ НАД ТЕЧЕНИЕМ ЗАБОЛЕВАНИЯ, Ме ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

TABLE 2. CONCENTRATION OF CYTOKINES IN BLOOD SERUM OF CHILDREN WITH BRONCHIAL ASTHMA WITH DIFFERENT LEVELS OF CONTROL OVER CLINICAL COURSE OF THE DISEASE, Me ($Q_{0,25}$ - $Q_{0,75}$)

Наименование группы Title of group	IL-2 (пг/мл) IL-2 (pg/mL)	IL-4 (пг/мл) IL-4 (pg/mL)	IL-10 (пг/мл) IL-10 (pg/mL)	TNF α (пг/мл) TNF α (pg/mL)
Группа 1 (КАБА) n = 51 Cohort 1 (CBA)	24,06 (7,96; 38,4)	5,27 (2,85; 7,8)	36,52 (20,5; 48,7)	16,61 (5,29; 29,5)
Группа 2 (НАБА) n = 59 Cohort 2 (UBA)	11,8 (8,5; 30,6)	5,83 (3,97; 14,8)	37,39 (21,7; 42,6)	25,6 (18,6; 31,5)
Группа 3 (контроль) n = 33 Cohort 3 (control)	5,2 (2,4; 7,2)	2,45 (0,84; 4,9)	15,89 (6,74; 27,8)	6,63 (2,58; 11,9)
p*	$p_{1,2} = 0,048$ $p_{1,3} = 0,006$ $p_{2,3} = 0,005$	$p_{1,2} = 0,48$ $p_{1,3} = 0,0019$ $p_{2,3} < 0,001$	$p_{1,2} = 0,98$ $p_{1,3} < 0,001$ $p_{2,3} < 0,001$	$p_{1,2} = 0,006$ $p_{1,3} < 0,001$ $p_{2,3} < 0,001$

Примечание. * – p – достоверность различий, критерий Манна–Уитни

Note. * p, significance of the differences, Mann–Whitney U-test.

болезни выявлено статистически значимо низкое содержание CD4⁺ лимфоцитов ($p = 0,039$), CD8⁺ лимфоцитов ($p = 0,05$) по сравнению с группой контролируемого течения болезни. Вследствие этого в группе НАБА при сравнении с группой КАБА статистически значимо ниже CD4⁺/CD8⁺ соотношение ($p = 0,047$). Также показано статистически значимо низкое содержание CD3⁺ клеток ($p = 0,025$) и CD4⁺ клеток ($p = 0,022$) в группе КАБА в сравнении группой контроля.

Выявлены изменения гуморального звена иммунитета, характерные для atopической бронхиальной астмы в целом – гиперпродукция IgE по сравнению с группой контроля ($p < 0,01$). Показано, что концентрация IgE в группе НАБА статистически значимо выше, чем в группе КАБА ($p = 0,047$). Также определена статистически значимо низкая концентрация IgA при неконтролируемом течении atopической бронхиальной астмы в сравнении с группой контроля ($p = 0,048$), тогда как при контролируемой АБА статистических различий не выявлено. Достоверных отличий в концентрации IgM в исследуемых группах не отмечено. Выявлена более высокая концентрация IgG в группе КАБА в сравнении с группой контроля ($p = 0,06$).

Для анализа патогенетических особенностей воспалительной реакции при atopической бронхиальной астме с различным уровнем контро-

ля над течением заболевания у детей изучены концентрации цитокинов провоспалительного (IL-2, TNF α) и противовоспалительного профиля (IL-4, IL-10) (табл. 2).

Выявлен более высокий уровень цитокинов Th1- (IL-2, TNF α) и Th2-профиля (IL-4, IL-10) в сыворотке крови при atopической бронхиальной астме, независимо от уровня контроля над течением заболевания, по сравнению с группой контроля. Содержание IL-2 в сыворотке крови при КАБА статистически значимо выше по сравнению с группой контроля ($p = 0,006$). Уровень IL-4 в сыворотке крови у больных из групп АБА статистически значимо выше по сравнению с группой контроля ($p=0,0019$), однако значимых отличий в концентрации IL-4 между группами КАБА и НАБА не выявлено ($p=0,48$). Концентрация IL-10 в сыворотке крови в группах АБА статистически значимо выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$). Показано, что концентрация TNF α при atopической бронхиальной астме статистически значимо выше по сравнению с группой контроля ($p < 0,001$), наиболее выраженное повышение отмечено в группе НАБА по сравнению с группой КАБА ($p = 0,006$).

Обсуждение

Результаты проведенного исследования показали статистически значимые различия некото-

рых иммунологических показателей в зависимости от уровня контроля над течением атопической бронхиальной астмы у детей.

При изучении показателей иммунного статуса в группе обследованных с отсутствием контроля над течением АБА нами выявлено низкое содержание Т-лимфоцитов, зрелых Т-лимфоцитов и Т-хелперных клонов лимфоцитов с $CD4^+$ и $CD8^+$ фенотипом в сыворотке крови. Возможно, снижение суммарного содержания Т-лимфоцитов свидетельствует о миграции этих клеток в очаг повреждения либо о подавлении дифференцировки Т-клеток, либо селективном апоптозе определенных фенотипов Т-лимфоцитов. При атопической бронхиальной астме происходит усиление инфильтрации слизистой оболочки бронхов активированными Т-лимфоцитами, эозинофилами, тучными клетками, макрофагами. Персистируя в дыхательных путях, эти клетки обеспечивают пролонгацию аллергического воспаления [2, 13, 17], переключая дифференцировку Th0-клеток в сторону Th2-типа, ответственных за секрецию цитокинов, участвующих в реакции гиперчувствительности немедленного типа [6, 7]. Показано, что при активном воспалении Т-лимфоциты утрачивают способность к миграции и апоптозу [16]. Выявлена обратная корреляционная связь между тяжестью бронхиальной астмы и количеством лимфоцитов периферической крови [2, 17, 18]. Изменения в гуморальном звене иммунитета обусловлены приоритетным синтезом IgE и увеличением концентрации тех иммуноглобулинов, которые реализуют реакцию гиперчувствительности немедленного типа [19, 20]. Закономерно, что при отсутствии контроля над течением атопической бронхиальной астмы, вследствие персистенции воспаления, наблюдается гиперпродукция IgE.

В группе с контролируемым течением атопической бронхиальной астмы нами отмечена статистически значимо низкая концентрация общего IgA в сыворотке крови ($p = 0,048$) в сравнении с группой контроля. Большое значение имеет способность IgA связывать аллергены и тем самым участвовать в аллерген-специфических иммунных механизмах аллергических реакций, в том числе при атопической бронхиальной астме. Селективный дефицит IgA характерен для пациентов с атопией [13, 19].

В ходе нашего исследования выявлено, что концентрация IL-4 статистически значимо выше у больных бронхиальной астмой по сравнению с группой контроля. Полученные нами данные сопоставимы с результатами исследований, что доказывает значимость IL-4 в поддержании персистенции воспаления и формировании тяжести

течения АБА [2, 15, 17, 22]. Одним из ключевых цитокинов, стимулирующих переключение синтеза иммуноглобулинов на IgE изотип, является IL-4, при атопии наблюдается усиленная его продукция [10, 21, 22]. Потенциально важная роль IL-4 в аллергическом воспалении — это его способность активизировать экспрессию молекул адгезии на эндотелиальных клетках сосудов, что приводит к усилению процесса адгезии в стенке сосудов Т-лимфоцитов, эозинофилов, базофилов и моноцитов, а это является характерным признаком аллергического воспаления [3, 4, 6, 8, 17].

По результатам настоящего исследования, концентрация в сыворотке крови иммунорегуляторного цитокина IL-10 достоверно выше в группе атопической бронхиальной астмы по сравнению с группой контроля. В ряде исследований показано, что снижение концентрации IL-10 коррелирует с тяжестью бронхиальной астмы [9, 17, 24, 25]. Интерлейкин-10 посредством ингибирования продукции провоспалительных цитокинов уменьшает активность Th1-лимфоцитов, способствуя В-клеточной активации и развитию иммунного ответа по Th2-типу [4, 6, 7].

В нашем исследовании показано, что концентрация TNF α достоверно выше у больных атопической бронхиальной астмой по сравнению с группой контроля, а также в группе НАБА в сравнении с группой КАБА. Провоспалительный цитокин TNF α ответственен не только за инициацию воспалительного процесса, но и за хронизацию атопического воспаления, усиливая гиперреактивность респираторного тракта [4, 7, 14]. TNF α обладает эффектом усиления воспаления при атопической бронхиальной астме, на что указывает повышение его концентрации в сыворотке крови в приступный период и при тяжелых неконтролируемых формах атопической бронхиальной астмы [1, 3, 18].

Таким образом, изучение популяционного и субпопуляционного состава лимфоцитов при контролируемом и неконтролируемом течении атопической бронхиальной астмы у детей позволило определить иммунологические маркеры неконтролируемого течения заболевания — снижение содержания в периферической крови Т-лимфоцитов с фенотипом $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$. Из показателей гуморального звена иммунитета в качестве прогностических признаков неконтролируемого течения болезни следует отметить следующие параметры: гиперпродукция IgE, низкое содержание общего IgA. При неконтролируемом течении АБА в сравнении с контролируемым течением выявлена более высокая концентрация TNF α в сыворотке крови, что также позволяет рассматривать данный показатель

в качестве маркера неконтролируемого течения заболевания.

Выявленные нами особенности некоторых иммунологических показателей, в зависимости

от уровня контроля атопической бронхиальной астмы, можно рекомендовать в качестве критериев прогноза неконтролируемого течения заболевания у детей.

Список литературы / References

1. Архипов В.В. Новые перспективы повышения контроля над бронхиальной астмой. От науки к практике // Практическая пульмонология, 2014. № 1. С. 67-76. [Arkhipov V.V. New prospects for increasing control over bronchial asthma. From science to practice. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical Pulmonology*, 2014, no. 1, pp. 67-76. (In Russ.)]
2. Барабаш Е.Ю., Калинина Е.П., Гвозденко Т.А., Денисенко Ю.К., Новгородцева Т.П., Антонюк М.В., Ходосова К.К. Регуляция иммунного ответа у пациентов с частично контролируемой и контролируемой бронхиальной астмой // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 1. С. 65-72. [Barabash E.Yu., Kalinina E.P., Gvozdenko T.A., Denisenko Yu.K., Novgorodtseva T.P., Antonyuk M.V., Khodosova K.K. Regulation of the immune response in patients with partially controlled and controlled bronchial asthma. *Meditinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2017, Vol. 19, no. 1, pp. 65-72. (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2017-1-65-72.
3. Гурьева Л.Л. Сывороточное содержание иммунорегуляторных цитокинов у детей, больных атопической бронхиальной астмой с разной степенью контроля над заболеванием // Медицинский вестник Башкортостана, 2014. Т. 9, № 3. С. 61-65. [Gurieva L.L. Serum content of immunoregulatory cytokines in children with atopic bronchial asthma with varying degrees of control over the disease. *Meditinskiy vestnik Bashkortostana = Medical Bulletin of Bashkortostan*, 2014, Vol. 9, no. 3, pp. 61-65. (In Russ.)]
4. Горячкина Л., Кашкин К. Клиническая аллергология и иммунология. М.: Миклош, 2009. 432 с. [Goryachkina L., Kashin K. Clinical allergology and immunology. Moscow: Miklosh, 2009. 432 p.]
5. Кайб И.Д., Петрушина А.Д., Никогосян А.С., Шайтарова А.В., Мальченко Л.А., Иванова Е.Е. Патогенетические аспекты воспаления при бронхиальной астме у детей дошкольного возраста // Медицинская наука и образование Урала, 2016. № 4. С. 80-82. [Kayb I.D., Petrushina A.D., Nikoghosyan A.S., Shaytarova A.V., Malchenko L.A., Ivanova E.E. Pathogenetic aspects of inflammation in bronchial asthma in preschool children. *Meditinskaya nauka i obrazovanie Urala = Medical Science and Education of the Urals*, 2016, no. 4, pp. 80-82. (In Russ.)]
6. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. СПб.: Фолиант, 2008. 552 с. [Ketlinskiy S.A., Simbirtsev A.S. Cytokines. St. Petersburg: Folio, 2008. 552 p.]
7. Намазова-Баранова Л.С. Аллергия у детей: от теории к практике. М.: Союз педиатров России, 2011. 668 с. [Namazova-Baranova L.S. Allergy in children: from theory to practice]. Moscow: Union of Pediatricians of Russia, 2011. 668 p.]
8. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Коноплева О.С. Цитокины и полиморфизм промоторных регионов генов (C-590T IL4, C-597A IL10) как маркеры неконтролируемого течения бронхиальной астмы у детей // Сибирский научный медицинский журнал, 2015. Т. 35, № 3. С. 4-8. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Konopleva O.S. Cytokines and polymorphism of promoter regions of genes (C-590T IL4, C-597A IL10) as markers of uncontrolled flow of bronchial asthma in children. *Sibirskiy nauchnyy meditsinskiy zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*, 2015, Vol. 35, no. 3, pp. 4-8. (In Russ.)]
9. Смольникова М.В., Смирнова С.В., Тютин О.С., Бычкова С.В. Полиморфизм генов цитокинов (IL4, IL10) и особенности иммунного реагирования в зависимости от уровня контроля над течением атопической бронхиальной астмы у детей // Российский аллергологический журнал, 2013. № 2. С. 23-28. [Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Tyutina O.S., Bychkovskaya S.V. Polymorphism of genes of cytokines (IL-4, IL-10) and features of immune reaction depending on the level of control over the course of atopic bronchial asthma at children. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergology Journal*, 2013, no. 2, pp. 23-28. (In Russ.)]
10. Al-Daghri N.M., Alokail M.S., Draz H.M., Abd-Alrahman S.H., Yakout S.M., Clerici M. Th1/Th2 cytokine pattern in Arab children with severe asthma. *Clin. Exp. Allergy*, 2014, Vol. 44, no. 2, pp. 222-230.
11. Brown S.D., Brown L.A., Stephenson S., Dodds J.C., Douglas S.L., Qu H., Fitzpatrick A.M. Characterization of a high TNF α phenotype in children with moderate-to-severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2015, Vol. 135, no. 6, pp. 1651-1654.
12. Brzozowska A., Majak P., Jerzyńska J., Smejda K., Bobrowska-Korzeniowska M., Stelmach W., Koczkowska M., Stelmach I. Exhaled nitric oxide correlates with IL-2, MCP-1, PDGF-BB and TIMP-2 in exhaled breath condensate of children with refractory asthma. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2015, Vol. 32, no. 2, pp. 107-113.
13. Carlier F.M., Sibille Y., Pilette C. The epithelial barrier and immunoglobulin A system in allergy. *Clin. Exp. Allergy*, 2016, Vol. 46, no. 11, pp. 1372-1388.
14. Chkhaidze I., Zirakishvili D., Shavshvishvili N., Barnabishvili N. Prognostic value of TH1/TH2 in infants with wheezing in a three year follow-up study. *Pneumonol. Alergol. Pol.*, 2016, Vol. 84, no 3, pp. 144-150.
15. Cui A.H., Zhao J., Liu S.X., Hao Y.S. Associations of IL-4, IL-6, and IL-12 levels in peripheral blood with lung function, cellular immune function, and quality of life in children with moderate-to-severe asthma. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 2014, Vol. 15, no. 7 (8), pp. 2286-2291.

16. Giovannini-Chami L., Albertini M., Scheinmann P., de Blic J. New insights into the treatment of severe asthma in children. *Paediatric Respiratory Reviews*, 2015, Vol. 16, no. 3, pp. 167-173.
17. Global Strategy for Asthma Management and Prevention, Global Initiative for Asthma (GINA). Update 2015 // <http://www.ginasthma.org>
18. Irvin C., Zafar I., Good J., Rollins D., Christianson C., Gorska M.M., Martin R.J., Alam R. Increased frequency of dual-positive TH2/TH17 cells in bronchoalveolar lavage fluid characterizes a population of patients with severe asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2014, Vol. 134, no. 5, pp. 1175-1186.
19. Kim W.J., Choi I.S., Kim C.S., Lee J.H., Kang H.W. Relationship between serum IgA level and allergy/asthma. *Korean J. Intern. Med.*, 2017, Vol. 32, no. 1, pp. 137-145.
20. Lama M., Chatterjee M., Chaudhuri T.K. Total serum immunoglobulin E in children with asthma. *Pediatr. Pulmonol.*, 2013, Vol. 48, no. 11, pp. 1062-1069.
21. Michaud B., Gouvis-Echraghi R., Candon S., Couderc R., Jais J.P., Bach J.F., Chatenoud L., Just J. Quantification of circulating house dust mite-specific IL-4- and IL-13-secreting T cells correlates with rhinitis severity in asthmatic children and varies with the seasons. *Indian J. Clin. Biochem.*, 2013, Vol. 28, no. 2, pp. 197-200.
22. Smirnova S., Smolnikova M., Tereshchenko S. Immune response and polymorphism of the cytokine genes (IL4, IL10 and IL2, TNFA) in atopic bronchial asthma in Russian children. *Allergy*, 2014, Vol. 69, p. 227 (551).
23. Smolnikova M.V., Smirnova S.V., Freidin M.B., Tyutina O.S. Immunological parameters and gene polymorphisms (C-590T IL4, C-597A IL10) in severe bronchial asthma in children from the Krasnoyarsk region. *West Siberia J. Circumpolar. Health.*, 2013, Vol. 5, p. 72.
24. Tomiita M., Campos-Alberto E., Shima M., Namiki M., Sugimoto K., Kojima H., Watanabe H., Sekine K., Nishimuta T., Kohno Y., Shimojo N. Interleukin-10 and interleukin-5 balance in patients with active asthma, those in remission, and healthy controls. *Postepy Dermatol. Allergol.*, 2015, Vol. 32, no. 2, pp. 107-113.
25. Vizmanos-Lamotte G., Moreno A., Munoz X., Gomez S., Gartner S., Cruz M.J. Induced sputum cell count and cytokine profile in atopic and non-atopic children with asthma. *Asia Pac. Allergy*, 2015, Vol. 5, no. 4, pp. 210-215.

Авторы:

Смольникова М.В. — к.б.н., ведущий научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН“» — обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Смирнова С.В. — д.м.н., профессор, руководитель научного направления, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН“» — обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Ильenkova Н.А. — д.м.н., профессор, заведующий кафедрой детских болезней с курсом ПО, ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Коноплева О.С. — к.м.н., младший научный сотрудник, ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр „Красноярский научный центр Сибирского отделения РАН“» — обособленное подразделение «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера»; ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет им. профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия

Authors:

Smolnikova M.V., PhD (Biology), Leading Research Associate, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center”, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Smirnova S.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Scientific Direction, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center”, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Ilyenkova N.A., PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatric Diseases with a PE course, Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Konopleva O.S., PhD (Medicine), Junior Research Associate, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Federal Research Center “Krasnoyarsk Science Center”, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences; Krasnoyarsk State V.F. Voino-Yasenetsky Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation

Поступила 21.04.2017
Отправлена на доработку 02.05.2017
Принята к печати 20.06.2017

Received 21.04.2017
Revision received 02.05.2017
Accepted 20.06.2017

ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ НК-КЛЕТОК И NKG2D-ПОЗИТИВНЫХ ЛИМФОЦИТОВ КАК МИШЕНЬ ДЛЯ ТЕРАПИИ БОЛЕЗНИ КРОНА

Шуленина Е.А.^{1,2}, Абакушина Е.В.³, Лысюк Е.Ю.^{1,4,5}

¹ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

² ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный Медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия

³ Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

⁴ ФГБУН «Институт биологии гена» РАН, Москва, Россия

⁵ ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Открытие полиморфизмов генов NOD2, ATG16L1, IRGM, ассоциированных с нарушением процесса аутофагии у пациентов с болезнью Крона (БК), позволило по-новому взглянуть на вопрос этиологии данного заболевания. На фоне генетически обусловленной дисфункции макрофагов все более вероятной представляется важная роль патогенов в индукции БК, что подтверждается данными о широком распространении среди пациентов с БК случаев хронической инфекции внутриклеточными патогенами *Mycobacterium paratuberculosis* и *E. coli*. Потеря макрофагами способности уничтожать внутриклеточные микроорганизмы ведет к хронической инфекции с повышенной продукцией провоспалительных цитокинов и повреждением собственных тканей.

Контроль за работой макрофагов осуществляют НК-клетки: связывание NKG2D-рецептора с молекулами MICA на поверхности макрофагов приводит к лизису последних. Передача сигнала через рецептор NKG2D может повысить функциональную активность НК в отношении дефектных макрофагов и, таким образом, усиливать их элиминацию. Кроме того, ввиду повышенной численности NKG2D⁺ лимфоцитов у пациентов с БК, использование растворимых форм MICA может изменить соотношение между цитотоксическими и регуляторными лимфоцитами в пользу последних и снизить продукцию провоспалительных цитокинов, которые поддерживают в кишечнике состояние хронического воспаления. В данном обзоре рассмотрены перспективные направления в изучении и терапии БК.

Ключевые слова: NKG2D, НК, MICA, макрофаги, аутоиммунитет, болезнь Крона

Адрес для переписки:

Шуленина Екатерина Алексеевна
ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ
117133, Россия, Москва, ул. Теплый стан, 21, корп. 1/232.
Тел.: 8 (915) 216-09-46.
E-mail: Ekaterina.shu.moscow@gmail.com

Address for correspondence:

Shuleniina Ekaterina A.
Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology
117133, Russian Federation, Moscow, Teply Stan 21, bldg 1, apt 232.
Phone: 7 (915) 216-09-46.
E-mail: Ekaterina.shu.moscow@gmail.com

Образец цитирования:

Е.А. Шуленина, Е.В. Абакушина, Е.Ю. Лысюк
«Перспективы использования НК-клеток и NKG2D-позитивных лимфоцитов как мишень для терапии болезни Крона» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 4. С. 461–470. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-461-470

© Шуленина Е.А. и соавт., 2017

For citation:

E.A. Shuleniina, E.V. Abakushina, E.Yu. Lyssuk "Potential usage of NK cells and NKG2D-positive lymphocytes as targets in therapy of Crohn's disease", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 4, pp. 461–470. doi: 10.15789/1563-0625-2017-4-461-470

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-4-461-470

POTENTIAL USAGE OF NK CELLS AND NKG2D-POSITIVE LYMPHOCYTES AS TARGETS IN THERAPY OF CROHN'S DISEASE

Shulenina E.A.^{a, b}, Abakushina E.V.^c, Lyssuk E.Yu.^{a, d, e}

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

^b First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

^c A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation

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

^e Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Autoimmune mechanisms of Crohn's disease have been extensively studied, following discovery of NOD2, ATG16L1, IRGM genetic polymorphisms associated with Crohn's disease. These genes play an important role in innate immune response against intracellular bacteria, in particular, due to their direct participation in a process known as autophagy. Due to mentioned genetic traits, the CD patients are more susceptible to chronic infections caused by intracellular pathogens. Recent studies revealed high incidence of intracellular infection with *Mycobacterium paratuberculosis* and *E. coli* in the intestinal tissue specimens and blood macrophages obtained from the CD patients. Such a chronic, non-resolved infection may disturb the immune cell properties and affect the balance of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, thus resulting into chronic inflammation, a hallmark of Crohn disease.

In this view, potential usage of NK cells aimed for influencing macrophage activity represents a new approach in understanding and treatment of autoimmune pathologies. The macrophages are controlled by NK cells. I.e., binding of NKG2D receptor to the MICA molecules on the macrophage surface causes their lysis.

A signal transfer via NKG2D receptor may increase functional activity of NK against defective macrophages, and hence, promote their elimination. Moreover, in Crohn patients with usually elevated NKG2D⁺ lymphocyte numbers, a stimulation of NKG2D⁺ cells by soluble MICA (sMICA) may influence the balance between cytotoxic and regulatory lymphocytes, and reduce pro-inflammatory cytokine secretion, in order to attenuate chronic inflammation of gut tissues. This review is aimed to discuss a role of NKG2D⁺ NK cells in Crohn's disease pathology and their possible implications for management and treatment of this disorder.

Keywords: NKG2D, NK, MICA, macrophages, autoimmunity, Crohn's disease

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

Дисфункция макрофагов в патогенезе болезни Крона

В 1977 г. М. Ward впервые предложил идею о «диспепсии макрофагов» как об этиологическом факторе болезни Крона (БК). Однако в силу отсутствия достаточной доказательной базы в пользу этой теории на первый план вышли инфекционная и аутоиммунная теории происхождения БК. Природа БК до сих пор остается не раскрытой, и в настоящее время появляется все больше данных, указывающих на первостепенную роль функциональной несостоятельности макрофагов. Возвращение к идее, предложенной еще в 70-х гг., связано в первую очередь

с результатами крупномасштабного исследования Genome-Wide Association study, которое выявило связь между БК и полиморфизмами в генах аутофагии *ATG16L1* and *IRGM*. Продукты этих генов выполняют ключевую роль в защите организма от внутриклеточных микроорганизмов. Предполагается, что нарушение работы этих генов в клетках моноцитарного ряда значительно снижает сопротивляемость организма к инфекциям, вызванным внутриклеточными микроорганизмами. В результате бактерии получают возможность длительно персистировать в клетках организма-хозяина. Внутриклеточная инфекция вызывает повышенную секрецию провоспалительных цитокинов, а зараженные клетки, в свою очередь, теряют способность адекватно отвечать на сигналы от окружающих тканей. Это приводит к снижению восприимчивости клетки к молеку-

лам-индукторам апоптоза. На этом фоне воспаление приобретает хронический характер, что в итоге ведет к извращению работы иммунной системы. Одними из основных регуляторов работы макрофагов в организме являются NK-клетки. Они усиливают литическую функцию инфицированных внутриклеточными патогенами макрофагов, а при наличии необратимых изменений запускают апоптоз клеток. Взгляд на основные вопросы этиопатогенеза БК с позиции несостоятельности аутофагии макрофагов открывает новые перспективы в изучении и терапии БК.

Полиморфизмы в генах аутофагии *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM* ***NOD2***

Относится к группе внутриклеточных паттерн-распознающих рецепторов, которые обеспечивают первую линию иммунной защиты при попадании патогена внутрь клетки. *NOD2* экспрессируется преимущественно в тканях кишечника: энтероцитах, клетках Панета и резидентных макрофагах собственной пластинки слизистой оболочки [25, 34]. *NOD2* непосредственно участвует в распознавании и элиминации внутриклеточных патогенов. У 40% пациентов с БК в странах Западной Европы были найдены полиморфизмы гена *NOD2*, ассоциированные с дефектом распознавания компонента бактериальной стенки — мурамилдипептида (MDP) [15, 22]. В норме образование комплекса *NOD2* с MDP в антиген-презентирующих клетках запускает процесс аутофагии [14]. Помимо этого, захваченные бактериальные антигены вместе с комплексом молекул МНС II транспортируются на мембрану клетки и служат для активации CD4⁺Т-лимфоцитов.

Потеря функциональной активности *NOD2* приводит к значительным дефектам в работе врожденного иммунитета. При этом нарушаются процессы презентации антигена [14], продукции антимикробных пептидов [43], уничтожения внутриклеточных патогенов [26]. Мутации в гене *NOD2* также ассоциированы с развитием синдрома Блау — системного заболевания, протекающего с образованием множественных гранул [31].

***ATG16L1*^{T300A}**

Найденный полиморфизм T300A (Thr300Ala) в гене *ATG16L1* (autophagy related 16-like 1) ассоциирован исключительно с БК. Предполагается, что этот ген участвует в индукции аутофагии в клетках кишечника. Под влиянием *NOD2* внутри клетки происходит транспорт белка *ATG16L1* к месту прохождения бактерии через мембрану

клетки и запускается процесс ксенофагии [40]. У мышей с аналогичной мутацией гена *ATG16L1* нарушается внутриклеточный сигнальный путь и, как следствие, иммунный ответ в отношении внутриклеточных бактерий [27]. *ATG16L1* нарушает внутриклеточную передачу провоспалительных сигналов от рецепторов *NOD1* и *NOD2*.

IRGM

Процесс аутофагии также обеспечивает ген *IRGM*. Полиморфизм в гене *IRGM* стойко ассоциирован с БК [30]. Мышиный ген *Irgm*, аналог человеческого *IRGM*, обеспечивает защиту клетки от внутриклеточных бактерий. Дефекты *Irgm1* приводят к снижению сопротивляемости животных к инфекциям, вызванным возбудителями *Toxoplasma gondii*, *Salmonella typhimurium*, *L. monocytogenes*, and *Mycobacterium tuberculosis* [20, 29]. «Выключение» гена *IRGM* в человеческих макрофагах также приводит к нарушению иммунного ответа в отношении внутриклеточных микроорганизмов [38]. Другой известный дефект работы гена *IRGM* связан с его прочным соединением с микроРНК, что приводит к пониженной экспрессии *IRGM*. Этот вариант обнаруживается у пациентов с БК, ассоциированной с инфекцией адгезивно-инвазивной *E. coli* (AIEC) [32].

Инфекционные агенты как этиологические факторы БК

Дефекты в генах аутофагии сами по себе не являются этиологическим фактором болезни Крона, однако их наличие значительно снижает способность макрофагов элиминировать внутриклеточные патогены, что значительно увеличивает вероятность развития хронической внутриклеточной инфекции. В данном контексте представляется весьма вероятным наличие связи между генетическим дефектом системы врожденного иммунитета и инфекции, развивающейся на ее фоне, которые вместе приводят к развитию характерной клинической картины БК.

Идея об инфекционной природе БК была высказана в конце прошлого века и вплоть до настоящего времени ее придерживаются многие исследователи по всему миру. В качестве этиологического фактора развития БК были предложены различные микроорганизмы, однако наибольшее количество данных было получено в отношении *Mycobacterium paratuberculosis* и *E. coli*. Общими для данных микроорганизмов свойствами являются: алиментарный путь заражения, способность проникать через эпителиальный барьер кишечной стенки и инфицировать макрофаги с развитием длительно персистирующей инфек-

ции. Для этих микроорганизмов была доказана способность уменьшать экспрессию сигнальных молекул с целью защиты инфицированных макрофагов хозяина от цитотоксического действия НК-клеток и Т-лимфоцитов.

E. coli

В популяционных исследованиях было выявлено, что в кишечной флоре пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника (ВЗК) чаще, чем у пациентов из контрольной группы, обнаруживаются штаммы адгезивно-инвазивной *E. coli* (АИЕС) [13, 26]. Ассоциированные с БК штаммы АИЕС проявляют адгезивные свойства по отношению к щеточной каемке энтероцитов тонкой кишки пациентов с БК, но не здоровых индивидумов [9]. АИЕС способны проникать через мукозальный барьер стенки кишечника, выживать в макрофагах и индуцировать секрецию TNF α и формирование гранул [6].

Mycobacterium avium paratuberculosis

Гипотеза об этиологической роли микобактерии при БК впервые была высказана 20 лет назад на основании сходства клинической картины поражения тонкого кишечника при БК и болезни Джона (John's diseases) у крупного рогатого скота [28]. Болезнь Джона представляет собой гранулематозный илеит с доказанным этиологическим агентом — *Mycobacterium avium paratuberculosis* (МАР).

Различным группам ученых удавалось выделить микобактерии из тканей пациентов с БК. Количество доказательств в пользу роли МАР продолжает расти. В результате масштабного геномного исследования более 75 тысяч образцов были получены данные о значительном проценте общих генов, ассоциированных с повышенной восприимчивостью к микобактерии и риском развития БК [23].

В этом году группа исследователей из Новой Зеландии под руководством John Atiken заявили о том, что им удалось выделить из макрофагов пациентов с БК L-форму *Mycobacterium avium paratuberculosis*. Согласно неопубликованным данным, культуры микобактерий без клеточной стенки были получены более чем у 98% пациентов с БК. Новые доказательства в пользу этиологической роли МАР были также получены группой ученых из Лондона под руководством John Hermon-Taylor: для диагностики МАР инфекции у пациентов с БК использовали МАР специфические флуоресцентные антитела. В клиническом исследовании REDHill BIO (International study NCT01951326) было изучено влияние антибио-

тиков, активных в отношении МАР, на частоту и продолжительность ремиссий заболевания у пациентов с БК. Первые результаты были опубликованы в 2013 году, согласно которым полная ремиссия заболевания наблюдалась в 44-88,5% случаев. В похожем исследовании с участием пациентов детского возраста сообщалось о ремиссии заболевания у 80% пациентов.

Важной характеристикой МАР и адгезивно-инвазивной *E. coli* является способность образовывать гранулемы — один из ключевых диагностических критериев БК. Наличие гранул во многих случаях позволяет отличить БК от неспецифического язвенного колита (НЯК). Гранулемы обнаруживают у 50-87% в стенке кишечника и у 20-38% в лимфатических узлах пациентов с БК [21].

Опубликованное в 2014 году исследование взаимоотношений между макрофагами и микобактериями позволяет по-новому взглянуть на патогенетическое значение гранул. Ранее считалось, что гранулемы представляют собой клеточный вал, отграничивающий патогенный микроорганизм от окружающих тканей, тем самым предотвращает диссеминацию возбудителя. Однако было показано, что первоначальные гранулемы, возникающие при микобактериальной инфекции, напротив, способствуют распространению возбудителя по организму [39]. Иницирующим сигналом для формирования гранул служит продукт гена *ESX1*, который представлен в консервативном участке всех патогенных микобактерий. Другие продукты бактерий стимулируют работу металлопротеаз в окружающих эпителиальных клетках, которые привлекают макрофаги в очаг инфекции. Инфицированные в первичном очаге макрофаги затем покидают первичные гранулемы и циркулируют по организму, создавая поздние гранулемы, или вторичные очаги, в других тканях.

Роль молекул МІСА в регуляции работы макрофагов и лимфоцитов

Макрофаги-резиденты кишечной стенки играют значительную роль в поддержании гомеостаза в кишечнике: удаляют фрагменты клеток, подвергшихся апоптозу, стимулируют репарацию энтероцитов и за счет продукции IL-10 поддерживают функциональную активность регуляторных Т-клеток [33].

Работа макрофагов регулируется механизмами врожденного иммунитета. Среди клеток, участвующих в регуляции работы макрофагов и дендритных клеток, особое место занимают

НК-клетки, которые способны напрямую или с помощью цитокинов усиливать фагоцитирующие и антигенпрезентирующие способности макрофагов. Одним из механизмов, направленных на предотвращение избыточного иммунного ответа, является регуляция незрелых или патологически измененных макрофагов с помощью NKG2D-MICA сигнала [37]. NKG2D относится к поверхностным активирующим рецепторам и преимущественно экспрессируется на НК-клетках, CD8⁺ и CD4⁺Т-лимфоцитах и некоторых антигенпрезентирующих клетках. Основным лигандом NKG2D являются «стресс-индуцированные» молекулы MICA и MICB, экспрессия которых увеличивается в клетках при повреждении, вирусной инфекции, опухолевой трансформации [1, 16].

Взаимодействие NKG2D рецептора на НК-клетках с MICA на клетках моноцитарного ряда приводит к лизису последних [11, 37]. Экспрессия MICA на макрофагах увеличивается под влиянием провоспалительных цитокинов, в частности IL-10. Данный механизм лежит в основе защиты от аутоиммунных реакций, которые могут возникать в результате презентации макрофагами антигенов собственных тканей организма и активации аутореактивных клонов лимфоцитов. У пациентов с воспалительными заболеваниями кишечника, к которым относятся болезнь Крона и неспецифический язвенный колит, были найдены полиморфизмы в гене *IL-10*, ассоциированные с пониженной продукцией IL-10. При низком уровне IL-10 значительно снижается эффективность НК-опосредованной элиминации макрофагов, что в условиях нарушенной аутофагии приводит к персистенции внутриклеточных патогенов в организме и развитию хронического воспалительного процесса. Активация НК-клеток и восстановление работы системы иммунологического надзора является перспективным направлением в лечении БК. На это указывают данные о положительном эффекте IL-10 в качестве терапии индуцированного колита у животных.

Стимуляция рецептора NKG2D на НК-клетках и Т-лимфоцитах у пациентов с БК может оказать комплексный терапевтический эффект, обусловленный одновременным воздействием на несколько звеньев патогенеза БК. В первую очередь эти эффекты связаны с прямым влиянием MICA на функциональную активность клеток иммунной системы.

В организме MICA существует в двух формах: поверхностной и растворимой (sMICA). Благо-

даря этой особенности молекулы MICA могут оказывать множественные эффекты в организме. Увеличение экспрессии поверхностной MICA происходит в условиях клеточного стресса, при инфекции или злокачественной трансформации клетки. Повышение поверхностной плотности MICA способствует активации иммунной системы и приводит к элиминации поврежденных клеток. В трансформированных клетках экспрессия MICA возрастает на ранних этапах опухолевого роста. Это служит активирующим сигналом для цитотоксических NKG2D⁺CD8⁺Т-лимфоцитов и НК-клеток, стимулирует их пролиферацию и повышает цитотоксические свойства [10, 43]. У пациентов с низким уровнем экспрессии MICA опухолевыми клетками прогностические показатели заболевания (продолжительность ремиссии, общая продолжительность жизни) достоверно уступают таковым у пациентов с сохранной экспрессией MICA [45]. Однако по мере прогрессии опухолевого заболевания в периферической крови могут быть обнаружены молекулы sMICA. Появление sMICA связано со способностью опухолевых клеток «сбрасывать» с поверхности молекулы MICA.

В отличие от поверхностной формы MICA повышение уровня sMICA препятствует адекватной работе иммунной системы и является одним из механизмов ускользания опухоли от иммунного ответа [1, 2, 3, 36]. За счет уменьшения плотности стрессовых молекул опухолевые клетки становятся менее заметными для иммунной системы. Более того, при избыточной стимуляции NKG2D рецептора молекулами sMICA запускается эндцитоз и внутриклеточная деградация рецептора. Добавление sMICA к выделенным от пациентов цитотоксическим NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитам способно остановить пролиферацию клеток. Это ведет к потере функциональной активности цитотоксических лимфоцитов и НК-клеток [3, 17, 41]. Данный феномен позволяет опухолевым клеткам оказывать дистанционное ингибиторное действие на лимфоциты и НК-клетки, позволяя, таким образом, ускользать опухоли от иммунного надзора [1, 5].

Параллельно с подавлением активности цитотоксических клеток sMICA стимулирует пролиферацию регуляторных Т-лимфоцитов: пропорционально увеличению уровня sMICA растет численность регуляторных NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитов. Клинически данные изменения проявляются в виде отсутствия ответа пациента на клеточную адоптивную терапию [4]. Данный механизм подавления иммунной системы

был также описан для некоторых аутоиммунных заболеваний: у пациентов с ювенильной формой системной красной волчанки (СКВ) из периферической крови были выделены NKG2D⁺CD4⁺ лимфоциты, проявляющие регуляторные свойства [18]. Высокие значения численности NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитов были ассоциированы с ремиссией заболевания. У пациентов с ювенильной формой СКВ количество NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитов было прямо пропорционально плазменному уровню sMICA [8], что указывает на роль NKG2D стимулирующего сигнала в активации регуляторных лимфоцитов.

Значительное увеличение популяции NKG2D⁺Т-лимфоцитов было обнаружено в периферической крови и ткани кишечника у животных с экспериментальным колитом, вызванным пересадкой донорских лимфоцитов [24]. Продemonстрирована прямая корреляция между уровнем экспрессии NKG2D рецептора и повышением продукции провоспалительных цитокинов IFN γ , IL-17 и TNF α . Введение животным анти-NKG2D антител приводило к уменьшению воспаления и улучшению течения заболевания в случаях умеренной формы колита. Клинические данные подтверждают результаты экспериментальных работ, свидетельствующих в пользу роли NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитов в патогенезе воспаления при БК. У пациентов с БК отмечается увеличение экспрессии MICA на энтероцитах [7], а в выделенных из собственной пластинки слизистой оболочки NKG2D⁺CD4⁺ лимфоцитах происходит увеличение уровня экспрессии NKG2D [24]. Помимо этого, наблюдается заметное увеличение популяции NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитов в крови и слизистой кишечника [12].

Протективное действие NK-клеток на стенку кишечника было доказано в модели CD4⁺Т-индуцированного колита. У животных без NK-клеток пересадка CD4⁺Т-лимфоцитов донора заканчивалась развитием тяжелой формы колита по сравнению с отсутствием признаков воспаления у животных с нормальным содержанием NK-клеток. Вероятно, что в основе данной иммунной реакции лежит активация NK-клеток, которые оказывают супрессивное действие на цитотоксические CD4⁺Т-лимфоциты. Протективные свойства NK-клеток также были продемонстрированы в модели DSS-индуцированного колита [19].

Мишенью для sMICA также могут являться Th17-лимфоциты. Увеличение популяции Th17-лимфоцитов считается одной из причин развития воспаления при БК. Th17 являются

источником цитокинов IL-17A, IL-17F, IL-22, TNF α , которые известны своей способностью потенцировать развитие аутоиммунных реакций. Созревание Th17-лимфоцитов происходит под действием IL-17. Терапия, направленная на уменьшение активности Th17-клеток, была признана эффективной в лечении псориаза, ревматоидного артрита, анкилозирующего спондилита. Эффективность использования комбинированной терапии антителами к IL-17A и IL-17F была продемонстрирована на животной модели Т-индуцированного колита [42]. Считается, что основным источником IL-17 являются NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоциты. Уровень экспрессии IL-17 в NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитах, выделенных из собственной пластинки пациентов с БК, значительно превышает таковой у здоровых доноров. Увеличение экспрессии IL-17 происходит пропорционально увеличению экспрессии NKG2D [35]. Снижение функциональной активности NKG2D⁺CD4⁺Т-лимфоцитов при помощи MICA-опосредованного сигналинга может уменьшить продукцию IL-17 и предотвратить созревание и пролиферацию Th17-лимфоцитов.

Заключение

С каждым годом появляется все больше данных, указывающих на этиологическую роль патогенных микроорганизмов в патогенезе БК. В биоптате кишечной стенки пациентов с БК с большей частотой, чем у здоровых индивидов обнаруживают *Mycobacterium paratuberculosis* и патогенные штаммы *E. coli*. По последним данным, L-форма *M. paratuberculosis* определяется в крови у подавляющего большинства пациентов с БК. Эти патогены объединяет способность инфицировать клетки макрофагального ряда и нарушать программу апоптоза, что способствует длительной персистенции патогенов в организме. Сильным аргументом в пользу данной теории стало открытие ассоциированных с развитием БК полиморфизмов генов *NOD2*, *ATG16L1*, *IRGM*, функция которых непосредственно связана с защитой от внутриклеточных микробов. В клинической практике гастроэнтерологи давно отметили эффективность лечения пациентов с БК антибиотиками широкого спектра действия, к которым чувствительны нетуберкулезные микобактерии.

В связи с этим чрезвычайно актуальным становится изучение особенностей врожденного иммунитета пациентов с БК, в частности NK-клеток, осуществляющих контроль за работой

лимфоидных клеток, включая клетки моноцитарного ряда. Особый интерес представляет активирующий рецептор NKG2D, который находится на мембране НК-клеток и Т-лимфоцитов. К лигандам NKG2D относятся стресс-индуцированные молекулы MICA, экспрессия которых усиливается в клетках, подвергшихся инфицированию или злокачественной трансформации. Повышение экспрессии MICA активирует НК-клетки и способствует элиминации измененных клеток. У пациентов с БК отмечается увеличение общего числа NKG2D⁺ лимфоцитов. Стимуляция NKG2D рецептора НК-клеток и Т-лимфоцитов у пациентов с БК может оказать комплексный терапевтический эффект, обуслов-

ленный одновременным воздействием на несколько звеньев патогенеза БК. MICA-NKG2D сигнал в НК-клетках может повысить их функциональную активность в отношении дефектных макрофагов. Использование sMICA также может способствовать росту популяции регуляторных Т-лимфоцитов и, таким образом, снизить продукцию провоспалительных цитокинов, которые в кишечнике поддерживают состояние хронического воспаления.

Таким образом, использование MICA-опосредованного сигналинга с целью модификации функциональной активности НК-клеток и Т-лимфоцитов представляет новый перспективный подход в изучении и терапии БК.

Список литературы / References

1. Абакушина Е.В. Роль стресс-индуцированных молекул MICA/B в противоопухолевом иммунном ответе // Злокачественные опухоли, 2012. Т. 2, № 2. С. 103-105. [Abakushina E.V. The role of stress-induced molecules MICA/B in the anti-tumor immune response. *Zlokachestvennyye opukholi = Malignant Tumors*, 2012, Vol. 2, no. 2, pp. 103-105. (In Russ.)]
2. Абакушина Е.В., Абакушин Д.Н., Неприна Г.С., Пасова И.А., Бердов Б.А., Климова А.В., Коваленко Е.И., Каприн А.Д. Повышение уровня цитокинов и стресс-индуцированных молекул MICA в сыворотке крови больных раком желудка и толстой кишки // Цитокины и воспаление, 2015. Т. 14, № 1. С. 63-67. [Abakushina E.V., Abakushin D.N., Neprina G.S., Pasova I.A., Berdov B.A., Klinkova A.V., Kovalenko E.I., Kaprin A.D. Elevation of serum levels of cytokines and stress-induced molecules MICA in patients with gastric and colon cancer. *Tsitokiny i vospalenie = Cytokines and Inflammation*, 2015, Vol. 14, no. 1, pp. 63-67. (In Russ.)]
3. Абакушина Е.В., Климова А.В., Каневский Л.М., Коваленко Е.И. Увеличение растворимых форм стресс-индуцированных молекул MICA при онкологических заболеваниях // Молекулярная медицина, 2014. № 3. С. 34-38. [Abakushina E.V., Klinkova A.V., Kanevskiy L.M., Kovalenko E.I. Elevation of serum levels of soluble forms of stress-induced molecules MICA in oncological diseases. *Molekulyarnaya meditsina = Molecular Medicine*, 2014, no. 3, pp. 34-38. (In Russ.)]
4. Абакушина Е.В., Маризина Ю.В., Пасова И.А., Козлов И.Г., Каприн А.Д. Критерии отбора пациентов больных меланомой для иммунотерапии активированными лимфоцитами на основе исходного уровня стресс-индуцированных молекул MICA // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, Специальный выпуск, № 3. С. 153-154. [Abakushina E.V., Marizina J.V., Pasova I.A., Kozlov I.G., Kaprin A.D. Selection criteria for patients with melanoma for immunotherapy by activated lymphocytes based on initial level of stress-induced molecules MICA. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia)*, 2015, Vol. 17, no. 3s, pp. 153-154. (In Russ.)]
5. Закеева И.Р., Бережной А.Е., Гнучев Н.В., Георгиев Г.П., Ларин С.С. Ингибиторные рецепторы лимфоцитов и их роль в противоопухолевом иммунитете // Вопросы онкологии, 2007. Т. 2, № 53. С. 140-149. [Zakeyeva I.R., Berezhnoy A.E., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. Lymphocyte inhibitory receptors functioning in anti-tumor immune response. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology*, 2007, Vol. 2, no. 53, pp. 140-149. (In Russ.)]
6. Agus A., Massier S., Darfeuille-Michaud A., Billard E., Barnich N. Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: opening up new therapeutic strategies. *Biomed Res Int.*, 2014, Art. ID 567929, 16 p.
7. Allez M., Tieng V., Nakazawa A., Treton X., Pacault V., Dulphy N., Caillat-Zucman S., Paul P., Gornet J.M., Douay C., Ravet S., Tamouza R., Charron D., Lémann M., Mayer L., Toubert A. CD4⁺NKG2D⁺ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology*, 2007, Vol. 132, no. 7, pp. 2346-2358.
8. Baecher-Allan C., Hafler D.A. Human regulatory T cells and their role in autoimmune disease. *Immunol. Rev.*, 2006, Vol. 212, pp. 203-216.

9. Barnich N., Carvalho F.A., Glasser A.L., Darcha C., Jantschke P., Allez M., Peeters H., Bommelaer G., Desreumaux P., Colombel J.F., Darfeuille-Michaud A. CEACAM6 acts as a receptor for adherent-invasive *E. coli*, supporting ileal mucosa colonization in Crohn disease. *J. Clin. Invest.*, 2007, Vol. 117, no. 6, pp. 1566-1574.
10. Bauer S., Groh V., Wu J., Steinle A., Phillips J.H., Lanier L.L., Spies T. Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science*, 1999, Vol. 285, no. 5428, pp. 727-729.
11. Braunstein J., Qiao L., Autschbach F., Schürmann G., Meuer S. T cells of the human intestinal lamina propria are high producers of interleukin-10. *Gut*, 1997, Vol. 41, no. 2, pp. 215-220.
12. Camus M., Esses S., Pariente B., Le Bourhis L., Douay C., Chardin V., Mocan I., Benlagha K., Clave E., Toubert A., Mayer L., Allez M. Oligoclonal expansions of mucosal T cells in Crohn's disease predominate in NKG2D-expressing CD4 T cells. *Mucosal Immunol.*, 2014, Vol. 7, no. 2, pp. 325-334.
13. Conte M., Longhi C., Marazzato M., Conte A.L., Aleandri M., Lepanto M.S., Zagaglia C., Nicoletti M., Aloisi M., Totino V., Palamara A.T., Schippa S. Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC) in pediatric Crohn's disease patients: phenotypic and genetic pathogenic features. *BMC Res. Notes*, 2014, Vol. 7, no. 1, p. 748.
14. Cooney R., Baker J., Brain O., Danis B., Pichulik T., Allan P., Ferguson D.J., Campbell B.J., Jewell D., Simmons A. NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation. *Nat. Med.*, 2010, Vol. 16, no. 1, pp. 90-97.
15. Cuthbert A.P., Fisher S.A., Mirza M.M., King K., Hampe J., Croucher P.J., Mascheretti S., Sanderson J., Forbes A., Mansfield J., Schreiber S., Lewis C.M., Mathew C.G. The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology*, 2002, Vol. 122, no. 4, pp. 867-874.
16. González S., Groh V., Spies T. Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2006, Vol. 298, no. 121-138.
17. Groh V., Smythe K., Dai Z., Spies T. Fas-ligand-mediated paracrine T cell regulation by the receptor NKG2D in tumor immunity. *Nat. Immunol.*, 2006, Vol. 7, no. 7, pp. 755-762.
18. Groh V., Wu J., Yee C., Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*, 2002, Vol. 419, no. 6908, pp. 734-738.
19. Hall L.J., Murphy C.T., Quinlan A., Hurley G., Shanahan F., Nally K., Melgar S. Natural killer cells protect mice from DSS-induced colitis by regulating neutrophil function via the NKG2A receptor. *Mucosal Immunol.*, 2013, Vol. 6, no. 5, pp. 1016-1026.
20. Henry S.C., Daniell X., Indaram M., Whitesides J.F., Sempowski G.D., Howell D., Oliver T., Taylor G.A. Impaired macrophage function underscores susceptibility to Salmonella in mice lacking Irgm1 (LRG-47). *J. Immunol.*, 2007, Vol. 179, no. 10, pp. 6963-6972.
21. Heresbach D., Alexandre J.L., Branger B., Bretagne J.F., Cruchant E., Dabadie A., Dartois-Hoguin M., Girardot P.M., Jouanolle H., Kerneis J., Le Verger J.C., Louvain V., Politis J., Richecoeur M., Robaszekiewicz M., Seyrig J.A. Frequency and significance of granulomas in a cohort of incident cases of Crohn's disease. *Gut*, 2005, Vol. 54, no. 2, pp. 215-222.
22. Inohara N., Ogura Y., Fontalba A., Gutierrez O., Pons F., Crespo J., Fukase K., Inamura S., Kusumoto S., Hashimoto M., Foster S.J., Moran A.P., Fernandez-Luna J.L., Nuñez G. Host recognition of bacterial muramyl dipeptide mediated through NOD2. Implications for Crohn's disease. *J. Biol. Chem.*, 2003, Vol. 278, no. 8, pp. 5509-5512.
23. Jostins L., Ripke S., Weersma R.K., Duerr R.H., McGovern D.P., Hui K.Y., Lee J.C., Schumm L.P., Sharma Y., Anderson C.A., Essers J., Mitrovic M., Ning K., Cleynen I., Theate E., Spain S.L., Raychaudhuri S., Goyette P., Wei Z., Abraham C., Achkar J.P., Ahmad T., Amininejad L., Ananthakrishnan A.N., Andersen V., Andrews J.M., Baidoo L., Balschun T., Bampton P.A., Bitton A., Boucher G., Brand S., Büning C., Cohain A., Cichon S., D'Amato M., De Jong D., Devaney K.L., Dubinsky M., Edwards C., Ellinghaus D., Ferguson L.R., Franchimont D., Fransen K., Gearry R., Georges M., Gieger C., Glas J., Haritunians T., Hart A., Hawkey C., Hedl M., Hu X., Karlsen T.H., Kupcinskis L., Kugathasan S., Latiano A., Laukens D., Lawrance I.C., Lees C.W., Louis E., Mahy G., Mansfield J., Morgan A.R., Mowat C., Newman W., Palmieri O., Ponsioen C.Y., Potocnik U., Prescott N.J., Regueiro M., Rotter J.I., Russell R.K., Sanderson J.D., Sans M., Satsangi J., Schreiber S., Simms L.A., Sventoraityte J., Targan S.R., Taylor K.D., Tremelling M., Verspaget H.W., De Vos M., Wijmenga C., Wilson D.C., Winkelmann J., Xavier R.J., Zeissig S., Zhang B., Zhang C.K., Zhao H., Silverberg M.S., Annesse V., Hakonarson H., Brant S.R., Radford-Smith G., Mathew C.G., Rioux J.D., Schadt E.E., Daly M.J., Franke A., Parkes M., Vermeire S., Barrett J.C., Cho J.H. Host-microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 2012, Vol. 491, no. 7422, pp. 119-124.

24. Kjellev S., Haase C., Lundsgaard D., Ursø B., Tornehave D., Markholst H. Inhibition of NKG2D receptor function by antibody therapy attenuates transfer-induced colitis in SCID mice. *Eur. J. Immunol.*, 2007, Vol. 37, no. 5, pp. 1397-1406.
25. Kobayashi K.S., Chamaillard M., Ogura Y., Henegariu O., Inohara N., Nuñez G., Flavell R.A. Nod2-dependent regulation of innate and adaptive immunity in the intestinal tract. *Science*, 2005, Vol. 307, no. 5710, pp. 731-734.
26. Lapaquette P., Bringer M.-A., Darfeuille-Michaud A. Defects in autophagy favour adherent-invasive *Escherichia coli* persistence within macrophages leading to increased pro-inflammatory response. *Cell Microbiol.*, 2012, Vol. 14, no. 6, pp. 791-807.
27. Lassen K.G., Kuballa P., Conway K.L., Patel K.K., Becker C.E., Peloquin J.M., Villablanca E.J., Norman J.M., Liu T.C., Heath R.J., Becker M.L., Fagbami L., Horn H., Mercer J., Yilmaz O.H., Jaffe J.D., Shamji A.F., Bhan A.K., Carr S.A., Daly M.J., Virgin H.W., Schreiber S.L., Stappenbeck T.S., Xavier R.J. Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2014, Vol. 111, no. 21, pp. 7741-7746.
28. Liverani E., Scaiola E., Cardamone C., Dal Monte P., Belluzzi A. Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis in the etiology of Crohn's disease, cause or epiphenomenon? *World J. Gastroenterol.*, 2014, Vol. 20, no. 36, pp. 13060-13070.
29. MacMicking J.D., Taylor G.A., McKinney J.D. Immune control of tuberculosis by IFN-inducible LRG-47. *Science*, 2003, Vol. 302, no. 5645, pp. 654-659.
30. McCarroll S.A., Kuruvilla F.G., Korn J.M., Cawley S., Nemesh J., Wysoker A., Shapero M.H., de Bakker P.I., Maller J.B., Kirby A., Elliott A.L., Parkin M., Hubbell E., Webster T., Mei R., Veitch J., Collins P.J., Handsaker R., Lincoln S., Nizzari M., Blume J., Jones K.W., Rava R., Daly M.J., Gabriel S.B., Altshuler D. Integrated detection and population-genetic analysis of SNPs and copy number variation. *Nat. Genet.*, 2008, Vol. 40, no. 10, pp. 1166-1174.
31. Miceli-Richard C., Lesage S., Rybojad M., Prieur A.M., Manouvrier-Hanu S., Häfner R., Chamaillard M., Zouali H., Thomas G., Hugot J.P. CARD15 mutations in Blau syndrome. *Nat. Genet.*, 2001, Vol. 29, no. 1, pp. 19-20.
32. Mimouna S., Bazin M., Mograbi B., Darfeuille-Michaud A., Brest P., Hofman P., Vouret-Craviari V. HIF1A regulates xenophagic degradation of adherent and invasive *Escherichia coli* (AIEC). *Autophagy*, 2014, Vol. 10, no. 12, pp. 2333-2345.
33. Murai M., Turovskaya O., Kim G., Madan R., Karp C.L., Cheroutre H., Kronenberg M. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. *Nat. Immunol.*, 2009, Vol. 10, no. 11, pp. 1178-1184.
34. Ogura Y., Lala S., Xin W., Smith E., Dowds T.A., Chen F.F., Zimmermann E., Tretiakova M., Cho J.H., Hart J., Greenson J.K., Keshav S., Nuñez G. Expression of NOD2 in Paneth cells: a possible link to Crohn's ileitis. *Gut*, 2003, Vol. 52, no. 11, pp. 1591-1597.
35. Pariente B., Mocan I., Camus M., Dutertre C.A., Ettersperger J., Cattan P., Gornet J.M., Dulphy N., Charron D., Lémann M., Toubert A., Allez M. Activation of the receptor NKG2D leads to production of Th17 cytokines in CD4⁺ T cells of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*, 2011, Vol. 141, no. 1, pp. 217-226.
36. Salih H.R., Rammensee HH-G., Steinle A. Cutting Edge: Down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J. Immunol.*, 2002, Vol. 169, no. 8, pp. 4098-4102.
37. Schulz U., Kreutz M., Multhoff G., Stoelcker B., Köhler M., Andreesen R., Holler E. Interleukin-10 promotes NK cell killing of autologous macrophages by stimulating expression of NKG2D ligands. *Scand. J. Immunol.*, 2010, Vol. 72, no. 4, pp. 319-331.
38. Singh S.B., Davis A.S., Taylor G.A., Deretic V. Human IRGM induces autophagy to eliminate intracellular mycobacteria. *Science*, 2006, Vol. 313, no. 5792, pp. 1438-1441.
39. Torraca V., Masud S., Spaink H.P., Meijer A.H. Macrophage-pathogen interactions in infectious diseases: new therapeutic insights from the zebrafish host model. *Dis. Models Mech.*, 2014, Vol. 7, no. 7, pp. 785-797.
40. Travassos L.H., Carneiro L.A., Ramjeet M., Hussey S., Kim Y.G., Magalhães J.G., Yuan L., Soares F., Chea E., Le Bourhis L., Boneca I.G., Allaoui A., Jones N.L., Nuñez G., Girardin S.E., Philpott D.J. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. *Nat. Immunol.*, 2010, Vol. 11, no. 1, pp. 55-62.
41. Waldhauer I., Steinle A. Proteolytic release of soluble UL16-binding protein 2 from tumor cells. *Cancer Res.*, 2006, Vol. 66, no. 5, pp. 2520-2526.

42. Wedebye Schmidt E.G., Larsen H.L., Kristensen N.N., Poulsen S.S., Lynge Pedersen A.M., Claesson M.H., Pedersen A.E. TH17 cell induction and effects of IL-17A and IL-17F blockade in experimental colitis. *Inflamm. Bowel Dis.*, 2013. Vol. 19, no. 8, pp. 1567-1576.
43. Wehkamp J., Salzman N.H., Porter E., Nuding S., Weichenthal M., Petras R.E., Shen B., Schaeffeler E., Schwab M., Linzmeier R., Feathers R.W., Chu H., Lima H., Fellermann K., Ganz T., Stange E.F., Bevins S.L. Reduced Paneth cell – defensins in ileal Crohn's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2005, Vol. 102, no. 50, pp. 18129-18134.
44. Zhang C., Zhang J., Wei H., Tian Z. Imbalance of NKG2D and its inhibitory counterparts: How does tumor escape from innate immunity? *Int. Immunopharmacol.*, 2005, Vol. 5, no. 7-8, pp. 1099-1111.
45. Zhang J., Xu Z., Zhou X., Zhang H., Yang N., Wu Y., Chen Y., Yang G., Ren T. Loss of expression of MHC class I-related chain A (MICA) is a frequent event and predicts poor survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.*, 2014, Vol. 7, no. 6, pp. 3123-3131.

Авторы:

Шуленина Е.А. — лаборант-исследователь лаборатории молекулярной иммунологии ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; обучающийся ГБОУ ВПО Первый Московский государственный Медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

Абакушина Е.В. — к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории клинической иммунологии, Медицинский радиологический научный центр им. А.Ф. Цыба — филиал ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Лысюк Е.Ю. — к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории генной терапии Федерального государственного бюджетного учреждения науки ФГБУН «Институт биологии гена» РАН; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной иммунологии Федерального государственного бюджетного учреждения ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник лаборатории молекулярной онкологии Научно-исследовательского института трансляционной медицины ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Authors:

Shulenina E.A., Junior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Student, First Moscow I.M. Sechenov State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abakushina E.V., PhD (Medicine), Senior Research Associate, Laboratory of Clinical Immunology, A. Tsyb Medical Radiological Research Centre, Branch of National Medical Research Radiological Centre, Moscow, Russian Federation

Lyssuk E. Yu., PhD (Biology), Senior Research Associate, Laboratory of Gene Therapy, Institute of Gene Biology, Russian Academy of Sciences; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Immunology, Dmitry Rogachev Federal Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Senior Research Associate, Laboratory of Molecular Oncology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow, Russian Federation

Поступила 12.12.2016
Отправлена на доработку 13.12.2016
Принята к печати 26.12.2016

Received 12.12.2016
Revision received 13.12.2016
Accepted 26.12.2016

**Материалы XVI Всероссийского научного Форума
с международным участием имени академика В.И. Иоффе
«ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ»
5-8 июня 2017 г.**

Тезисы, не вошедшие в Специальный выпуск журнала
«Медицинская иммунология», 2017, т. 19

**КЛИНИКО-ИММУНОЛОГИЧЕСКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ
ПРОИЗВОДНОГО АДАМАНТАНА В ТЕРАПИИ
АСТЕНИЧЕСКИХ РАССТРОЙСТВ ПРИ НАЧАЛЬНЫХ
ПРОЯВЛЕНИЯХ НЕДОСТАТОЧНОСТИ
КРОВΟΣНАБЖЕНИЯ МОЗГА**

Давыдова Е.В.

ФГБОУ ВО «Южно-Уральский государственный
медицинский университет», Челябинск, Россия

В понимании механизмов развития астенических расстройств у ветеранов современных войн с начальными проявлениями недостаточности кровоснабжения мозга (НПНКМ) особая роль принадлежит неспецифической стресс-индуцированной дезорганизации эмоциональных структур лимбико-ретикулярной системы. С позиций нейроиммунологии, воздействие на одну из систем закономерно влечет изменения остальных функциональных модулей. Одним из наиболее эффективных современных препаратов для коррекции астении является производное адамантана N-(2-адамантил)-N-(парабромфенил)-амин (препарат Ладастен®), обладающий сочетанным психостимулирующим, актопротекторным, анксиолитическим и иммуномодулирующим действием.

Цель исследования: Оценить влияние Ладастена на проявления астении и иммунологические показатели клеточного компартмента у ветеранов с НПНКМ.

Материалы и методы. Организация исследования одобрена этическим комитетом ГБОУ ВО ЮУГМУ (протокол № 11 от 9 ноября 2013 г.), от всех больных получено информированное согласие на участие в исследовании. Методом случайной выборки из группы ветеранов с НПНКМ были отобраны 30 человек. На протяжении 14 дней ветераны с НПНКМ, включенные в исследование, амбулаторно получали монотерапию препаратом Ладастен в дозе 50 мг 2 раза в день. Курсовая доза составила 1,4 г. Анкетирование, оценку клинического и нейropsychологического статуса, эффективности лечения по шкале общего клинического впечатления (CGI) проводили до начала терапии Ладастеном, на 7 и 14 сутки приема препарата; забор венозной крови для исследования проводили до лечения и на 14 сутки. Контрольная группа состояла из 24 мужчин-военнослужащих того же возраста, условно здоровых, без проявлений НПНКМ. Всем пациентам проводилась оценка жалоб, психопатологической и соматоневрологической симптоматики с определением выраженности проявлений по 5-балльной рейтинговой шкале вербальных оценок. Определение популяционного состава лимфоцитов проводили методом проточной цитометрии на лазерном цитометре

Epics™ XL™ и Cytomicx FC 500 фирмы Beckman Coulter, США. Для окрашивания были использованы двухпараметрические реагенты линии IOTest: CD3-FITC/CD19-PE, CD3-FITC/CD4-PE, CD3-FITC/CD8-PE, CD3-FITC/CD(16+56)-PE, CD3-FITC/CD25-PE, CD3-FITC/-HLA-DR-PE. Достоверность различий оценивали в рамках программы STATISTICA vers.6.0, согласно критериям непараметрической статистики (Колмогорова–Смирнова, U-test Mann–Whitney).

Результаты и обсуждение. Терапевтическое действие Ладастена уже на 7 сутки приема препарата проявлялось редукцией симптомов тревоги, эмоциональной лабильности, раздражительности ($p = 0,01$), уменьшением числа пациентов с явлениями головной боли ($p < 0,01$), за счет модулирующего влияния Ладастена на процессы ГАМК-ергической медиации. На 14 сутки приема препарата значительно уменьшилось количество пациентов, отмечающих явления слабости, апатии, быстрой физической и умственной утомляемости, связанное с проявлением психостимулирующего эффекта препарата, в основе которого лежит тропность к DRc D3-подтипу рецепторов дофамина стриатума. Можно предполагать, что сочетание психостимулирующего, анксиолитического, вегетотропного в совокупности дает выраженный кумулятивный антиастенический эффект, на что указывают показатели терапевтической эффективности по шкале общего клинического впечатления (CGI), согласно которым, после курсового приема Ладастена «большое» и «очень большое» улучшение достигнуто у 26 пациентов (86,6%). Наряду с антиастеническим действием установлено выраженное влияние Ладастена на иммунную систему, проявляющееся в виде роста в системной циркуляции лейкоцитов, Т-хелперов, NK-лимфоцитов за счет интенсивности лейкопоэза на уровне центральных органов иммуногенеза. Показано увеличение в циркуляции относительного и абсолютного количества CD25⁺ позитивных лимфоцитов, готовых к реализации пролиферативного потенциала клетки, индуцируемого IL-2, непосредственно связанное с проявлением комитогенного эффекта Ладастена в виде активации конечных эффекторов МАП-киназного каскада – протеинкиназ ERK1/2. Таким образом, выраженная терапевтическая эффективность Ладастена, обусловленная наличием комплексного антиастенического, иммуностропного, актопротекторного эффектов препарата, минимумом побочных эффектов позволяет рекомендовать его в качестве препарата выбора для лечения астенических расстройств при начальных проявлениях недостаточности кровоснабжения мозга.

ПРИМЕНЕНИЕ 13-ВАЛЕНТНОЙ ПНЕВМОКОККОВОЙ КОНЬЮГИРОВАННОЙ ВАКЦИНЫ ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ ВНЕБОЛЬНИЧНОЙ ПНЕВМОНИИ У ВОЕННОСЛУЖАЩИХ

**Жоголев С.Д., Азаров И.И., Аминев Р.М.,
Жоголев К.Д., Котов С.С., Горенчук А.Н.,
Журкин М.А., Жоголев Д.К., Удальцов О.Е.**

Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург,
Россия

В связи с высоким уровнем заболеваемости внебольничной пневмонией военнослужащих по призыву для профилактики внебольничных пневмоний в войсках с 2000 года применяется 23-валентная пневмококковая полисахаридная вакцина (ППВ23) «Пневмо 23». В настоящее время, согласно национальному календарю прививок (приказ Минздрава РФ № 125н от 2014 г.), вакцинация против пневмококковой инфекции должна осуществляться призывникам перед призывом на воинскую службу.

С 2012 года на территории РФ разрешена к применению 13-валентная пневмококковая конъюгированная вакцина (ПКВ13) «Превенар 13», включающая до 90% серотипов, наиболее часто вызывающих пневмококковую бактериемию, сепсис, менингит, инвазивную пневмонию, острый средний отит и др. ПКВ13 в отличие от ППВ23 способна формировать антипневмококковый иммунитет у детей раннего возраста (до 2-х лет) и обладает рядом других преимуществ, позволяющих рекомендовать применение вакцины не только детям, но и взрослым: она более иммуногена, вызывает более прочный Т-зависимый иммунитет, формирует коллективный иммунитет, препятствующий циркуляции пневмококков в организованных коллективах. В этой связи вакцина «Превенар 13» представляется перспективной для профилактики пневмоний у военнослужащих.

Цель работы. Провести апробацию применения в воинском коллективе 13-валентной конъюгированной вакцины «Превенар 13» для профилактики внебольничных пневмоний у военнослужащих.

Материалы и методы. Нами в конце ноября 2015 года впервые в войсках осуществлена вакцинация 124 новобранцев одного из подразделений учебного центра вакциной «Превенар 13» и изучена ее эпидемиологическая эффективность в сравнении с вакциной «Пневмо 23», которой были вакцинированы 122 военнослужащих по призыву другого подразделения. Возрастной состав (18-22 года) и условия службы и быта личного состава обоих подразделений были одинаковы.

Результаты. В обеих группах вакцинированных частота развития общих и местных побочных реакций не превышала 3-4%. После вакцинации за 3 месяца наблюдения в группе военнослужащих, вакцинированных «Превенар 13», заболеваемость острыми болезнями органов дыхания была в 1,4 раза меньше, чем среди вакцинированных «Пневмо 23» ($p < 0,05$); суммарная заболеваемость ОРЗ и острыми бронхитами была меньше в 1,2 раза, а острыми тонзиллитами — в 3,4 раза. Также среди вакцинированных «Превенар 13» не было ни одного заболевшего пневмонией, тогда как среди вакцинированных «Пневмо 23» возникло 3 случая пневмонии.

Заключение. Таким образом, пневмококковая конъюгированная вакцина «Превенар 13» более эффективно снижала заболеваемость пневмонией и другими острыми болезнями органов дыхания у военнослужащих по при-

зыву, чем полисахаридная вакцина «Пневмо 23». В этой связи вакцинацию призывников по месту жительства и новобранцев, не охваченных прививками против пневмококковой инфекции перед призывом, предпочтительнее осуществлять вакциной «Превенар 13».

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МАКРОФАГОВ ИНТАКТНЫХ ЖИВОТНЫХ

**Поздина В.А.¹, Луговец Д.В.^{2,3}, Улитко М.В.^{2,3},
Данилова И.Г.¹**

¹ Институт иммунологии и физиологии УрО РАН,
Екатеринбург, Россия;

² Уральский федеральный университет имени первого
Президента России Б.Н. Ельцина, Екатеринбург,
Россия;

³ ГИЗ СО «Институт медицинских клеточных
технологий», Екатеринбург, Россия

Введение. Макрофаги составляют систему фагоцитирующих мононуклеаров (СФМ) и характеризуются структурной и функциональной гетерогенностью, которая зависит от степени зрелости, от области локализации, а также от их активации антигенами или лимфоцитами. Появление современных методов исследований позволяет оценить морфологическую и функциональную гетерогенность макрофагов различных органов, что делает возможным прогнозирование системы ответа СФМ при патологии.

Цель и задачи. В связи с этим функциональная характеристика макрофагов интактных животных была основной целью нашей работы.

Материалы и методы. В качестве объекта исследования использовали первичные культуры тканевых макрофагов, выделенных из различных органов самцов линии Wistar (мсп = 220 г). Выделяли альвеолярные и перитонеальные макрофаги, а также макрофаги печени и селезенки. Исследовали морфометрические показатели, показатели жизнеспособности и функциональной активности.

Типирование макрофагов в культуре проводили двумя методами: иммуногистохимическим методом с использованием моноклональных антител CD68 и методом инкубирования клеток с красителем нейтральным красным. Жизнеспособность клеток оценивали путем прямого подсчета клеток с использованием красителя 0,4%-ного трипанового синего.

Оценку пролиферативной активности макрофагов осуществляли, используя иммуноцитохимический метод окраски на клеточный маркер пролиферации белок Ki-67. Секреторную активность макрофагов оценивали цистохимическим методом выявления неспецифической эстеразы по Лефлеру и иммуофлюоресцентным методом определения индуцибельной NO-синтетазы (iNOS).

Основные результаты. Установлено содержание CD68-позитивных клеток в изучаемых культурах, от $74,0 \pm 9,0\%$ до $83,0 \pm 1,0\%$. Данные, полученные методом инкубирования клеток с нейтральным красным, не имели достоверных отличий от данных, полученных иммуноцитохимическим методом окраски на CD68, процент макрофагов составляет от $77,0 \pm 6\%$ до $88,0 \pm 1,4\%$ в зависимости от вида макрофагальной культуры. Это свидетельствует о том, что оба метода позволяют идентифицировать ма-

крофаги в полученных культурах с одинаковой эффективностью.

Клетки макрофагов всех исследуемых органов после выделения характеризуются высокой жизнеспособностью, от $73,0 \pm 11,0\%$ до $83,0 \pm 2,0\%$.

Макрофаги в культуре обладали низкой степенью пролиферативной активности. Экспрессия маркера Ki-67 проявляется в единичных ядрах клеток.

При исследовании иммуноцитохимической реакции на iNOS методом конфокальной микроскопии были получены следующие значения иммунофлуоресценции iNOS в макрофагах разных органов: альвеолярные — $7,41 \pm 1,28$, перитонеальные — $4,37 \pm 0,99$, макрофаги печени и селезёнки — $4,96 \pm 1,43$ и $2,47 \pm 1,02$ соответственно. Можно предположить, что альвеолярные макрофаги обладают повышенной активностью iNOS.

Все исследованные популяции макрофагов интактных животных характеризуются низкой степенью экспрессии

эстеразы. Наибольшую ферментативную активность проявили макрофаги печени и альвеолярные макрофаги, средний цитоцитохимический коэффициент которых составляет $1,29 \pm 0,09$ и $1,21 \pm 0,04$ соответственно. Среди печеночных макрофагов было выявлено $3,12 \pm 0,01\%$ клеток с резко положительной реакцией и $22,79 \pm 1,94\%$ клеток со средне положительной реакцией на неспецифическую эстеразу, $1,63 \pm$, альвеолярных макрофагов продемонстрировали среднеположительную реакцию.

Заключение. Таким образом, была установлена функциональная гетерогенность макрофагов различных органов в культуре. Полученный результат является основой дальнейшего исследования поляризации и функциональных особенностей резидентных макрофагов при патологии. Исследования поддержаны программой УрО РАН №15-3-4-17 и постановлением № 211 Правительства РФ, контракт № 02.A03.21.0006.

КОНЕНКОВ ВЛАДИМИР ИОСИФОВИЧ **(К 70-ЛЕТИЮ СО ДНЯ РОЖДЕНИЯ)**



12 июля исполнилось 70 лет академику Российской академии наук, профессору, доктору медицинских наук, заслуженному деятелю науки Российской Федерации, научному руководителю Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии Коненкову Владимиру Иосифовичу.

Коненков Владимир Иосифович родился 12 июля 1947 года в городе Гера Германской Демократической Республики в семье военнослужащего. В 1971 году окончил лечебный факультет Новосибирского государственного медицинского института. По окончании института работал младшим, старшим научным сотрудником, руководителем лаборатории в Институте клинической и экспериментальной медицины, а затем в Институте клинической иммунологии СО РАМН. С 1993 года Коненков В.И. был избран заместителем директора по науке ИКИ СО РАМН, с 2001 года — заместителем председателя по научной работе Сибирского отделения РАМН. С 2004 года по 2015 год В.И. Коненков — директор Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии (НИИКЭЛ), с 2015 года является научным руководителем организации.

В 1977 году Коненков В.И. защитил кандидатскую диссертацию на тему «Роль сывороточных факторов в активации цитотоксических реакций лимфоцитов при ревматизме», в 1986 году — докторскую на тему «Иммуногенетика нарушений иммунитета при диффузных заболеваниях соединительной ткани». В 1991 году ему присвоено ученое звание «профессор» по специальности «аллергология и иммунология». В 1997 году избран членом-корреспондентом РАМН, в 2004 году — академиком РАМН по специальности «иммунология», с 2014 года В.И. Коненков — академик РАН. В 2009 году присвоено звание «Заслуженный деятель науки Российской Федерации».

Академик Коненков В.И. является известным специалистом в области клинической лимфологии, клинической иммунологии и иммуногенетики. Результаты его работ хорошо известны и высоко оценены как российскими, так и зарубежными учеными и широко обсуждаются на регулярных научных конгрессах в различных странах.

Коненков В.И. — автор более 450 статей в ведущих отечественных и зарубежных журналах, более 400 публикаций в материалах различных научных форумов, 18 монографий, включая 2-томное «Руководство по клинической иммунологии, аллергологии, иммуногенетике и иммунофармакологии», «Функциональные свойства лимфоидных клеток», «Проблемы лимфоангиологии», «Лимфология». Результаты его исследований активно внедряются в клиническую практику и защищены 22 патентами Российской Федерации и 4 авторскими свидетельствами.

Коненковым В.И. создана школа высококвалифицированных специалистов в области клинической иммунологии и иммуногенетики. Им подготовлено 32 специалиста, получивших ученую степень доктора или кандидата медицинских наук. Ученики Владимира Иосифовича работают во многих научных центрах России и за ее пределами.

Исследования В.И. Коненкова связаны с выявлением генетических механизмов формирования патологического процесса, изучением генетической детерминированности функциональных свойств лимфоидных клеток, во многом реализующих защитные свойства лимфатической системы.

Под руководством В.И. Коненкова проводятся пионерные исследования по молекулярно-генетическим механизмам регуляции межклеточных взаимодействий в ходе воспалительных процессов при различных заболеваниях человека. Исследованиями структуры регуляторных участков генов интерлейкинов, продуцируемых лимфоидными клетками, доказано, что от их вариантов прямо зависит уровень продукции провоспалительных цитокинов, что предопределяет исход взаимодействия организма человека с инфекционными агентами и характер течения заболевания. Создана уникальная система иммуногенетического прогноза предрасположенности человека к заболеваниям онкологического характера.

ческой, дисметаболической, аллергической, аутоиммунной и инфекционно-воспалительной природы. Определены генетические предикторы ответа на терапию генно-инженерными препаратами при ревматических заболеваниях.

В.И. Коненковым внесен заметный вклад в изучение закономерностей регуляции ангиогенеза и лимфангиогенеза при эндокринной, сердечно-сосудистой и аутоиммунной патологии. Определен вклад генетических факторов в развитие нарушений процесса ангиогенеза в условиях ишемии. Выявлены комбинированные генетические признаки, включающие варианты генов ангиогенных факторов роста, цитокинов и матриксных металлопротеиназ, ассоциированные с высокой и низкой предрасположенностью к развитию ишемической болезни сердца, инфаркта миокарда, сосудистых осложнений сахарного диабета, возрастной макулярной дегенерации и других заболеваний. Разработаны новые подходы к терапевтическому ангиогенезу при хронической сердечной недостаточности, синдроме диабетической стопы на основе клеточных технологий.

Широкое признание получили результаты исследований В.И. Коненкова по проблемам экологии, в которых впервые была доказана генетическая природа реакций организма человека на воздействие таких экстремальных экологических факторов, как проживание в приполярных регионах и радиационные воздействия ядерных производств и ядерных полигонов. Под руководством Коненкова В.И. в экспедиционных исследованиях впервые были получены данные об иммуногенетической структуре монголоидов Таймыра, Чукотки, Тувы и Алтая, вошедшие в мировые банки данных создания единых схем эволюции и миграции населения планеты.

Коненков В.И. принимает активное участие в международных многоцентровых клинических исследованиях. В качестве члена Европейской Федерации иммуногенетиков участвует в международных научных программах, проводя комплексные сравнительные исследования по проблемам популяционной иммуногенетики. Коненков В.И. является членом Европейской Антивоспалительной Лиги (The European League Against Rheumatism), Международного Общества лимфологов.

Знаком признания научной и общественной деятельности академика РАН В.И. Коненкова является его избрание в руководящие органы научных обществ, а также в редакционные советы многих российских научно-медицинских журналов. Коненков В.И. ведет значительную научно-организационную работу, исполняя обязанности члена Объединенного ученого совета СО РАН по медицинским наукам, члена Президиума Российского научного общества иммунологов, члена Президиума Российской ассоциации по остеопорозу, члена Правления Российской ассоциации ревматологов, председателя Правления Сибирского общества ревматологов, члена Правления Российского общества лимфологов, члена Экспертного совета при главном специалисте ревматологе Минздравсоцразвития РФ, заместителя председателя защитного совета Д001.01.01 при НИИКИ по специальности «аллергология и иммунология», члена совета ДМ001.045.01 при НИИ медицинской генетики.

Коненков В.И. — член редакционных советов научных журналов: «Цитокины и воспаление», «Научно-практическая ревматология», «Российский журнал иммунологии», «Медицинская иммунология», «Иммунопатология. Аллергология. Инфектология», «Сибирский научный медицинский журнал», «Хирургия, морфология, лимфология», «Проблемы клинической медицины», «Вестник лимфологии», «Остеопороз и остеопатии».

Владимир Иосифович проявил себя талантливым организатором и руководителем актуальных научных направлений в области современной иммунологии и лимфологии, а результаты его научных изысканий способствуют успешному решению важных прикладных и фундаментальных проблем медицинской науки и здравоохранения. Его высокий профессионализм, широкая эрудиция, умение достигать максимальных результатов в решении поставленных задач снискали заслуженное уважение научного сообщества в России и за ее пределами.

За достигнутые трудовые успехи и многолетнюю добросовестную работу Коненков В.И. награжден медалью Ордена «За заслуги перед Отечеством» II степени, медалью им. П. Эрлиха Европейской академии естествознания, орденом Пирогова Европейской академии естествознания, Золотой медалью «За выдающиеся достижения в области иммунологии» от Президиума Российского научного общества иммунологов, медалью Российского Научного Медицинского Общества Терапевтов за многолетнюю безупречную работу и активное участие в деятельности Российского Научного Медицинского Общества Терапевтов, почетным знаком «Золотая сигма» Сибирского отделения РАН за многолетний творческий труд и большой вклад в развитие науки.

Коллектив НИИ клинической и экспериментальной лимфологии сердечно поздравляет Владимира Иосифовича Коненкова с юбилеем и желает ему крепкого здоровья, счастья, долгих лет жизни, оптимизма, дальнейших творческих и трудовых успехов!

XVI ВСЕРОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ С МЕЖДУНАРОДНЫМ УЧАСТИЕМ ИМЕНИ АКАДЕМИКА В.И. ИОФФЕ «ДНИ ИММУНОЛОГИИ В САНКТ-ПЕТЕРБУРГЕ» 5 – 8 ИЮНЯ 2017 ГОДА, САНКТ-ПЕТЕРБУРГ, РОССИЯ

XVI Всероссийский научный Форум с международным участием имени академика В. И. Иоффе «Дни иммунологии в Санкт-Петербурге» состоялся в Санкт-Петербурге 5 – 8 июня 2017 года в Конгресс-Холле «Васильевский».

Основными организаторами Форума являлись Институт экспериментальной медицины, НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера и Первый СПбГМУ им. акад. И. П. Павлова, Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И.Мечникова, Северо-Западный федеральный медицинский исследовательский Центр имени В.А. Алмазова в сотрудничестве с такими общественными организациями, как Санкт-Петербургское отделение Российской Ассоциации аллергологов и клинических иммунологов и Российское научное общество иммунологов, Российское цитокиновое общество, Всероссийское научно-практическое общество эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Российское научное общество лабораторной диагностики, Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины». Традиционно Форум проходил под эгидой Минздрава, РАН, Роспотребнадзора при поддержке Правительства Санкт-Петербурга в лице Комитета по здравоохранению и Комитета по науке и высшей школе.

На Форуме 2017 г. состоялось вручение Почетного Знака имени академика В.И. Иоффе, учрежденного в 2003 г. СЗО РАМН и СПб РО РААКИ, следующим лауреатам:

- академику РАН, профессору Недоспасову Сергею Артуровичу в номинации «За достижения в области фундаментальной иммунологии»;
- члену-корреспонденту РАН, профессору Симбирцеву Андрею Семеновичу в номинации «За достижения в области клинической иммунологии».

На Форуме традиционно обсуждались самые актуальные вопросы фундаментальной и прикладной иммунологии, в частности современные направления в изучении иммунорегуляции, иммунодиагностики и иммунокоррекции. Это нашло отражение и в тематике материалов, представленных в этом году для участия в Форуме. Внимание многих участников Форума привлекли проблемы: антицитокиновой терапии аутоиммунных заболеваний, создания новых вакцин, модуляции иммунного ответа при опухолевом росте и при вирусных инфекциях, биологической роли антибиотических пептидов, механизмов баланса микробиоты и иммунной системы организма.

Были приглашены ведущие иммунологи страны для чтения на Форуме пленарных лекций по наиболее злободневным проблемам фундаментальной и прикладной иммунологии. Кроме пленарных лекций и секционных заседаний, в научную программу Форума были включены несколько научных симпозиумов и круглых столов для обсуждения дискуссионных вопросов фундаментальной и прикладной иммунологии. Секционные заседания традиционно были посвящены проблемам иммунорегуляции, диагностике и лечению иммунопатологических состояний, первичным иммунодефицитам, онкологическим заболеваниям, иммунологии репродукции. Также значительно расширилась тематика запланированных симпозиумов, включающая: «Первичные иммунодефицитные состояния: вчера,

сегодня, завтра», «ВИЧ-инфекция и коморбидные состояния», «Вирусные гепатиты», «Интерфероны: от теории к практике», «Цитокины в иммунорегуляции, иммунодиагностике и иммунотерапии», «Иммунология туберкулеза», «Таргетная иммунотерапия в пульмонологии», «Микробиота. Иммуни-тет. Инфекция», «Современные направления иммунофармакологии».

Наиболее острые дискуссии состоялись на заседаниях круглых столов: «Есть ли вторичный иммунодефицит при острых респираторных вирусных инфекциях?» и «Лечение ОРВИ и гриппа у аллергиков. Взгляд врача аллерголога и инфекциониста». Была проведена, ставшая уже традиционной, открытая дискуссия «Иммунологическая революция» по проблемам фундаментальной и клинической иммунологии.

Сохранена завоевавшая популярность традиция проведения отдельных заседаний «Клуба молодого иммунолога», посвященных вопросам фундаментальной и прикладной иммунологии с докладами самых молодых участников Форума. Был проведен также специальный сателлитный симпозиум на тему «Первичные иммунодефициты» в рамках Международного образовательного проекта по первичным иммунодефицитам при активном участии отечественных и зарубежных специалистов.

В программе Форума сохранилась ставшая популярной традиция проведения заседаний «Клуба молодого иммунолога» и конкурса молодежных научных работ.

В качестве сателлитных мероприятий состоялись: полуфинальный отбор программы УМНИК; Всероссийская школа «Проточная цитометрия в диагностике иммунодефицитных состояний», которая проходила параллельно с заседаниями Форума, включала лекции ведущих специалистов и практические занятия для овладения современными методами и современными приборами для лабораторной иммунологической диагностики.

Доклады, представленные на трех заседаниях «Клуба молодого иммунолога», свидетельствуют о том, что молодежь занята наиболее современными проблемами фундаментальной и прикладной иммунологии, владеет широким арсеналом современных иммунологических и молекулярно-биологических методов. Лучшие доклады молодых иммунологов были отмечены и награждены конкурсной комиссией.

Первое место «Конкурсе молодого иммунолога» по номинации «Фундаментальная иммунология» заняла Гоголева Виолетта Сергеевна (Москва); второе место – Ерохина Софья Алексеевна (Москва); третье место – Баженов Дмитрий Олегович (Санкт-Петербург).

Первое место в «Конкурсе молодого иммунолога» по номинации «Клиническая иммунология» заняла Капитанова Ксения Сергеевна (Москва); второе место – Крынский Сергей Андреевич (Москва); третье место – Валеева Алина Рамилевна (Казань).

Также был проведен конкурс на лучший стендовый доклад по трем номинациям: иммунорегуляция, иммунодиагностика и иммунотерапия.

Первое место в «Конкурсе на лучший стендовый доклад» в номинации «Фундаментальная иммунология» заняли Губернаторова Е.О., Друзкая М.С., Недоспасов С.А., Туманов А.В. «Изучение роли IL-6 в экспериментальной модели астмы у мышей» (Москва); второе место – Рубакова Э.И., Капина М.А., Логунова Н.Н., Майоров К.Б., Апт А.С. «Регуляторные клетки в контроле иммунного ответа и воспалительного процесса в легких при туберкулезе» (Москва); третье место – Белякова К.Л., Шевелева А.Р., Сельков С.А., Соколов Д.И. «Влияние НК-клеток на ангиогенез в присутствии фактора роста эндотелия сосудов» (Санкт-Петербург).

Первое место в «Конкурсе на лучший стендовый доклад» в номинации «Клиническая иммунология» занял доклад Ница Н.А., Старостина Н.М., Попова Н.Д., Баранов С.И., Кожевников Ю.А., Чумасова О.А., Шевела Е.Я., Останин А.А. «Эффективность клеточной терапии деформирующего остеоартроза: результаты промежуточного анализа» (Новосибирск); второе место – Косякова Н.И., Прохоренко С.В., Андреева Л.А., Панкратова Е.В., Сахаров П.А. «Поиск новых биомаркеров инфекционных обострений атопической бронхиальной астмы» (г. Пушкино, Москва); третье место – При-

луцкий А.С., Ткаченко К.Е. «Сенсибилизация к антигенам различных сортов яблок у лиц взрослого возраста» (Донецк).

Всего в работе Форума приняли участие 512 человек. Форум вполне оправдал название Всероссийский, т.к. в нем приняли участие специалисты из 44 регионов России: Абакан, Астрахань, Бердск, Великий Новгород, Владивосток, Волгоград, Екатеринбург, Иваново, Ижевск, Иркутск, Казань, Калининград, Калужская область, Караганда, Кемерово, Киров, Краснодар, Красноярск, Курск, Москва, Московская область, Нальчик, Нижний Новгород, Новосибирск, Оренбург, Орел, Пенза, Пермь, Петрозаводск, Пушкино, Ростов-на-Дону, Самара, Санкт-Петербург, Саранск, Саратов, Сочи, Томск, Тюмень, Улан-Удэ, Уфа, Хабаровск, Челябинск, Ярославль. Международное участие было представлено участниками из США, Белоруссии, Донецкой Республики, Латвии, Украины, Узбекистана.

На форуме 2017 г. по сравнению с предыдущими годами отчетливо проявилась тенденция методического совершенствования исследований отечественных иммунологов, укрепления приборной базы, более широкого использования автоматизированных методов с объективным учетом результатов. Судя по представленным материалам, из года в год расширяется сфера применения иммуномодулирующих препаратов и других способов иммунокоррекции.

Все участники Форума, зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru, получили 14 зачетных единиц (кредитов) по специальностям: «аллергология и иммунология» или «клиническая лабораторная диагностика». Также во время проведения Форума можно было пройти циклы усовершенствования (зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru и <https://edu.rosminzdrav.ru>) по специальностям: «аллергология и иммунология», «клиническая лабораторная диагностика».

Проведение Форума сопровождалось специализированной выставкой, призванной познакомить участников Форума с новейшими иммунологическими и молекулярно-биологическими технологиями, применяемыми для иммунодиагностики и иммунотерапии.

Оргкомитет считает своим приятным долгом выразить благодарность Генеральному спонсору — компании «Медипал Онко», Главным спонсорам — компаниям «Бекман Культер» и «НПО Петровакс Фарм», а также спонсорам и участникам выставки, финансовая поддержка которых сделала возможными организацию и проведение Форума.

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства (<http://mimmun.ru>) в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше.

Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1 β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление. — 2012. — Т. 11, №1. — С. 64–69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1 β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation*, 2012, Vol. 11, no. 1, pp. 64–69.

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. — М.: Анахарсис, 2009. — 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. *Moscow: Anacharsis*, 2009, 328 p.

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. *J. Immunol.*, 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503–5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. *Basic and Clinical Immunology*. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appleton & Lange, 1994, pp. 66–79.

Ссылки на литературные источники в тексте статьи, в рисунках и таблицах обозначаются арабскими цифрами в квадратных скобках [1, 2, 3,...]. не допускаются ссылки на диссертации, авторефераты диссертаций, публикации в сборниках, методические документы местного уровня. Количество источников не ограничено. В каждой ссылке приводятся все авторы работы. Неопубликованные статьи в список не включаются.

Обозначения, сокращения и единицы измерения

Для сложных терминов или названий, наиболее часто используемых в тексте статьи, можно ввести (в круглых скобках после первого упоминания полного названия термина) не более 3–5 нетрадиционных сокращений. Узаконенные международными номенклатурами сокращения используются в соответствующей транскрипции. Например, для термина «интерлейкин» используется сокращение «IL»,

а не русскоязычный вариант «ИЛ»; аналогично этому используются сокращения: «TNF», а не «ТНФ» или «ФНО»; «CD», а не «СД». Названия микроорганизмов приводятся в оригинальной транскрипции с использованием курсива (*E. coli*, *Streptococcus pyogenes*). Единицы измерения приводятся без точки после их сокращенного обозначения (с, ч, см, мл, мг, kDa и т.д.), регламентированного международными правилами.

Оформление иллюстративного материала

Иллюстративный материал должен быть оригинальным, то есть ранее нигде не опубликованным. Общее количество иллюстраций (таблиц и рисунков) не должно превышать восьми. При большем количестве иллюстраций их публикация оплачивается автором. Публикация цветных иллюстраций (независимо от их количества) также оплачивается автором. Весь иллюстративный материал присылается в двух экземплярах и на диске в виде отдельных файлов.

Размеры иллюстраций:

- максимальная высота — 210 мм
- максимальная ширина для 1 столбца — 82 мм, для 2 столбцов — 170 мм

Таблицы. Каждая таблица печатается на отдельном листе (в отдельном файле на диске) через 2 интервала. Нумерация таблиц дается арабскими цифрами отдельно от нумерации рисунков (графиков и фотографий). Название печатается над таблицей. Весь текст на русском языке, содержащийся в таблице, включая единицы измерения, должен быть переведен на английский язык; при этом перевод следует помещать в ячейку с соответствующим русским текстом отдельной строкой. Название таблицы и текст примечания к ней также должны быть переведены на английский язык и приведены под русским текстом с новой строки. Для пометок в таблицах следует использовать одну или несколько (*). Пояснения печатаются после соответствующего количества (*) под таблицей. Единицы измерения, при необходимости, включаются в заголовки строк или столбцов.

Рисунки (графики и фотографии). В тексте статьи названия рисунков (графиков, фотографий) и таблиц размещаются сразу после абзаца, где на них дается первая ссылка. Все рисунки нумеруются последовательно арабскими цифрами по мере их использования в тексте статьи. Названия рисунков и подписи к ним выносятся в виде списка на отдельную страницу. В списке указываются: номер рисунка, название (с большой буквы), текст примечаний (для микрофотографий должно быть указано увеличение). Подписи к рисункам даются краткие, но достаточно информативные. Названия рисунков и примечаний к ним, нарисовочные подписи, текст легенды должны быть переведены на английский язык и размещены под соответствующим текстом с новой строки. На обороте каждой иллюстрации подписывается фамилия первого автора, название статьи и порядковый номер. Для публикации в журнале принимаются только оригиналы фотографий (не ксерокопии) хорошего качества, максимально приближенные к вышеуказанным размерам.

Фотографии не должны иметь больших полей, т. е. фотографический материал должен занимать всю площадь фотографии. Рисунки могут быть представлены в графических форматах с расширением .tiff (разрешение не менее 300 dpi при 100% масштабе), .eps или .ai. Изображения, встроенные в документы Word, не принимаются. Графики и диаграммы предоставляются вместе с таблицами, на основе которых они были созданы, или с численными обозначениями показателей, отображаемых соответствующими графическими элементами (столбиками, секторами и т.п.) в виде файлов с расширениями .doc или, предпочтительнее, .xls.

Плата за публикацию статей

При соблюдении правил публикация статей в журнале «Медицинская иммунология» является бесплатной для авторов и учреждений, в которых они работают. Редакция может потребовать оплату в следующих случаях: 1) за публикацию цветных иллюстраций; 2) при большом количестве иллюстративного материала (свыше 8 иллюстраций).

Подготовка статей

Для представления статьи авторы должны подтвердить нижеследующие пункты. Статья может быть отклонена, если она им не соответствует.

- А. Направляя статью в журнал, авторы гарантируют, что поданные материалы не были ранее опубликованы полностью или по частям, в любой форме, в любом месте или на любом языке. Также авторы гарантируют, что статья не представлена для рассмотрения и публикации в другом журнале. С момента принятия статьи к печати в журнале «Медицинская иммунология» приведенный в ней материал не может быть опубликован авторами полностью или по частям в любой форме, в любом месте и на любом языке без согласования с руководством журнала. Исключением может являться: 1) предварительная или последующая публикация материалов статьи в виде тезисов или короткого резюме; 2) использование материалов статьи как части лекции или обзора; 3) использование автором представленных в журнал материалов при написании диссертации, книги или монографии. Воспроизведение всего издания или части любым способом запрещается без письменного разрешения издателей. Нарушение закона будет преследоваться в судебном порядке. Охраняется Законом РФ № 5351-1 «Об авторском праве и смежных правах» от 09.07.93 г.
- Б. Файл отправляемой статьи представлен в формате .doc, .docx, .rtf.
- В. Помимо файла со статьей, предоставлены следующие файлы:
 - 1) Файл с метаданными (при загрузке в систему ему присваивается имя «Метаданные»):
 - Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность автора, ответственного за дальнейшую переписку с редакцией (на русском и английском языках).
 - Название учреждения, где работает ответственный автор (в русском и официально принятом английском вариантах).

- Почтовый адрес для переписки с указанием почтового индекса (на русском и английском языках).
- Телефон, факс (с указанием кода страны и города), e-mail.
- Фамилия и инициалы остальных соавторов, их ученые степени, ученые звания, должности.
- Полное название статьи, направляемой в редакцию.
- Количество страниц текста, количество рисунков, количество таблиц.
- Указать, для какого раздела журнала предназначена работа: оригинальные статьи, лекции, обзоры, «точка зрения», краткие сообщения, новые иммунологические методы, случаи из практики, дневник иммунолога, книжное обозрение.
- Дата отправления работы.

2) Отсканированная копия файла с метаданными, подписанная всеми авторами (при загрузке в систему ему присваивается имя «Подписи авторов»)

3) Титульный лист (при загрузке в систему ему присваивается имя «Титульный лист»), по форме:

- название статьи (без использования каких-либо сокращений) (на русском и английском языках);
- Фамилия, имя, отчество, ученая степень, ученое звание, должность всех авторов (полностью) (на русском и английском языках);
- подразделение и учреждение, в котором выполнялась работа (если в работе участвовали авторы из разных учреждений, это должно быть отмечено звездочками) (в русском и официально принятом английском вариантах);
- сокращенное название статьи для верхнего колонтитула (не более 35 символов, включая пробелы и знаки препинания) (на русском и английском языках);
- не менее 6 ключевых слов на русском и английском языках;
- адрес для переписки с указанием телефона, номера факса и адреса e-mail.

4) Резюме (при загрузке в систему ему присваивается имя «Резюме»). Предоставляется в виде одного абзаца без ссылок и специфических сокращений. Объем — не менее 300 слов. Резюме в полном объеме представляется также в переводе на английский язык. В отдельных случаях, по решению редакционной коллегии, может быть затребован развернутый вариант резюме на английском языке.

5) Рисунки, если они есть - каждый отдельным файлом (при загрузке в систему каждому рисунку присваивается имя «Рисунок. Название рисунка (где название рисунка соответствует содержащемуся в файле рисунку. Порядковый номер рисунка)»)

6) Файл в формате .doc, .docx, rtf, с названиями рисунков

7) Таблицы, если они есть - каждая отдельным файлом (Название каждой таблицы должно быть приведено заголовком в файле с самой таблицей)

8) Файл с цитируемой литературой (при загрузке в систему ему присваивается имя «Литература»), по следующей форме: таблица из четырех столбцов (альбомная ориентация), где:

Порядковый номер ссылки	Авторы, название публикации и источника, где она опубликована, выходные данные	ФИО, название публикации и источника на английском	Полный интернет-адрес (URL) цитируемой статьи
Размещаются в таблице в алфавитном порядке, вначале русскоязычные, затем на языках с латинской графикой	Указывать по библиографическому стандарту, представленному выше	Официальное англоязычное название публикации и источника, где она опубликована - для русскоязычных статей. В редких случаях, когда не существует официальных англоязычных названий (это возможно для таких типов публикаций, как тезисы, книги и др.) - редакция просит предоставить их перевод, используя красный цвет шрифта. Для англоязычных публикаций и источников в этом столбце ставится прочерк	В том случае, если информация о статье не размещена на официальном сайте издания, допустимо использовать URL статьи со сторонних сайтов, в том числе системы www.e-library.ru

Текст должен быть набран с одинарным межстрочным интервалом; используется кегль шрифта в 14 пунктов; для выделения используется курсив, а не подчеркивание; все ссылки на иллюстрации, графики и таблицы расположены в соответствующих местах в тексте, а не в конце документа.

Текст соответствует стилистическим и библиографическим требованиям.

Если вы отправляете статью в рецензируемый раздел журнала, то вы согласны с требованиями слепого рецензирования, подробнее о котором можно узнать на сайте журнала (<http://mimmun.ru>) из рубрики **Рецензирование**, в разделе **«О Журнале»**.

Вы можете оформить подписку на журнал «Медицинская иммунология» через отделения связи: Каталог «Роспечать» — индекс 83030; Каталог «Пресса России» — индекс 42311. Подписка на электронную версию журнала на сайте www.elibrary.ru

АВТОРСКИЙ УКАЗАТЕЛЬ

Абакушина Е.В.	461	Кореньков Д.А.	375	Семикина Е.Л.	409
Алексеева А.А.	431	Короткова О.В.	401	Сенников С.В.	359
Борунова А.А.	401	Куликова Е.В.	359	Смирнова С.В.	453
Брагвадзе Б.Г.	431	Курбатова О.В.	409	Смольникова М.В.	453
Ганковская Л.В.	431	Курочкина Ю.Д.	387	Старостина Н.М.	387
Ганковский В.А.	431	Леплина О.Ю.	387, 421	Стукова М.А.	375
Давыдова Е.В.	441	Лосев И.В.	375	Ступак В.В.	421
Донина С.А.	375	Лысюк Е.Ю.	461	Табачков Д.В.	401
Ерофеева М.К.	375	Мишинов С.В.	421	Тихонова М.А.	387, 421
Заботина Т.Н.	401	Найхин А.Н.	375	Топтыгина А.П.	409
Закиров Р.Ш.	409	Намазова-Баранова Л.С.	431	Тыринова Т.В.	421
Зурочка А.В.	441	Огурцова А.Д.	431	Хантакова Ю.Н.	359
Ильенкова Н.А.	453	Олейник Е.А.	387	Хорева М.В.	431
Кадагидзе З.Г.	401	Останин А.А.	387, 421	Черенова Л.В.	329
Калиновский А.В.	421	Панчук И.О.	401	Чернов С.В.	421
Каштиго Т.В.	329	Петричук С.В.	409	Черных Е.Р.	387, 421
Кнауэр Н.Ю.	359	Петухова Г.Д.	375	Шмаров М.М.	329
Комах Ю.А.	409	Руденко Л.Г.	375	Шульнина Е.А.	461
Коноплева О.С.	453	Саядян Х.С.	329		
Копыльцова Е.А.	409	Свитич О.А.	431		

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

аденовирус человека	329	неконтролируемая астма	454
аденовирус шимпанзе	329	периферическая толерантность	360
аденовирусный вектор	329	перфорин	402, 422
антиген-специфический Т-клеточный ответ ...	387	пандемические вирусы гриппа	375
астенический синдром	441	провоспалительные цитокины	431
атопическая бронхиальная астма	454	проточная цитометрия	431, 402
аутоиммунитет	461	субпопуляции лимфоцитов	402, 410
болезнь Крона	461	субпопуляции CD4 ⁺ лимфоцитов	410
бронхиальная астма	431	толерогенные дендритные клетки	360
вакцина	329	Т-регуляторные клетки	360
вакцина гриппозная	375	хроническая ишемия мозга	441
вирус гриппа	375	хронический вирусный гепатит С	387
возрастные нормы	410	центральная толерантность	360
В-регуляторные клетки	360	цитокины	454
глиобластома	422	экспрессия гена	431
гранзим Б	422	CD107a	422
дендритные клетки	387, 422	CD16	402
иммуноглобулины	454	CD56	402
иммунологическая память	375	Core	387
иммунологическая толерантность	360	MICA	461
иммунотерапия	387	NK	461
иммуотропное действие	441	NKG2D	461
иммуофенотип	402	NK-лимфоциты	402
интерферон-альфа	422	NKT-лимфоциты	402
инфекционные заболевания	329	NS3	387
клинические испытания	329	Th17	410
контролируемая астма	454	TLR2	431
Ладастен	441	TLR4	431
макрофаги	461	Treg	410
маркер заболевания	454		

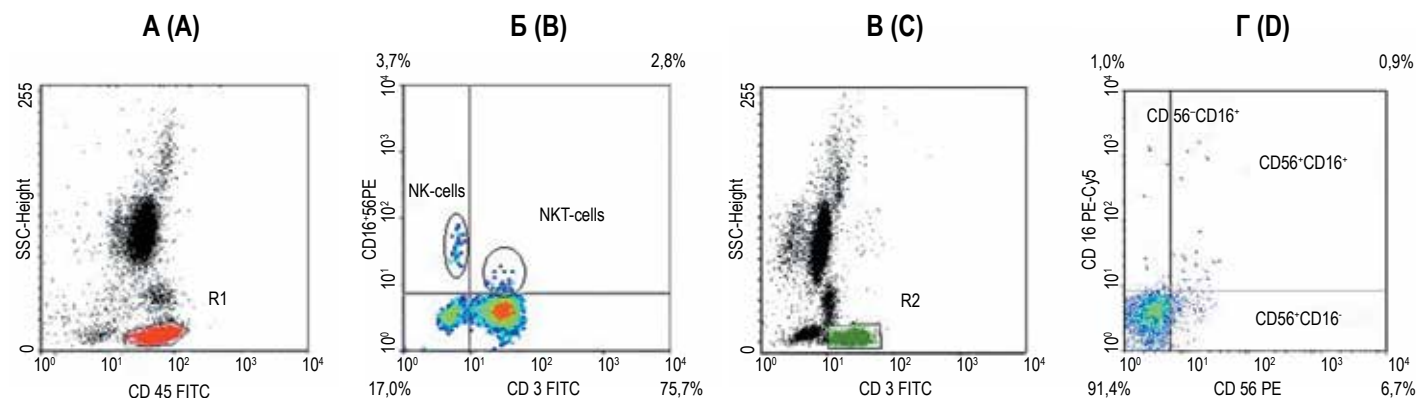


Рисунок 1. Цитометрический анализ НКТ-клеток здоровых доноров

Примечание. А – в дот-плоте CD45⁺ vs SSC выбирали гейт лимфоидных клеток. Б – среди 45⁺ клеток визуализировали популяцию НКТ-клеток (CD3⁺CD56⁺CD16⁺), которая составила 2,8%. В – последующее гейтирование CD3⁺ лимфоцитов из 45⁺ позитивных клеток. Г – субпопуляционная структура НКТ-клеток.

Figure 1. Cytometric analysis of NKT cells of healthy donors

Note. A, in the dot-plot CD45⁺ vs SSC we choose the "lymphoid" cell gate. B, a population of NKT cells (CD3⁺CD56⁺CD16⁺), is visualized among CD45⁺ cells (2.8%). C, CD3⁺ lymphocytes are gated from the 45⁺ positive cells. D, a subset structure of NKT cells.

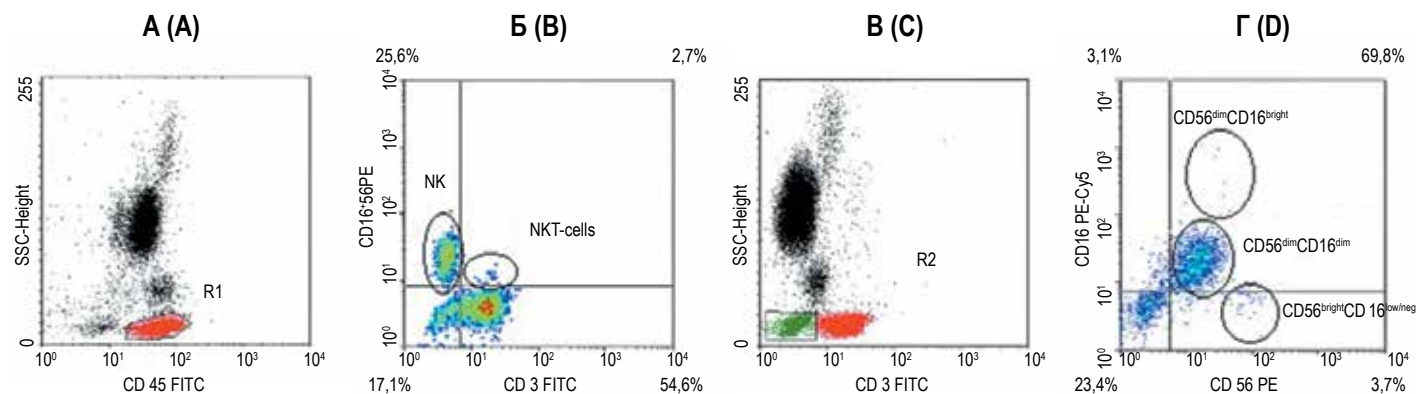


Рисунок 2. Цитометрический анализ НК-клеток здоровых доноров

Примечание. А – в дот-плоте CD45⁺ vs SSC выбирали гейт лимфоидных клеток. Б – среди 45⁺ клеток визуализировали популяцию НК-клеток (CD3⁺CD56⁺CD16⁺), которая составила 25,6%. В – последующее гейтирование CD3⁺ лимфоцитов из 45⁺ позитивных клеток. Г – субпопуляционная структура НК-клеток.

Figure 2. Cytometric analysis of NK cells in healthy donors

Note. A, in the dot-plot CD45⁺ vs SSC we choose the "lymphoid" cell gate. B, the NK cells (CD3⁺CD56⁺CD16⁺) population is visualized among the 45⁺ (25.6%). C, CD3⁺ lymphocytes are gated from the 45⁺ positive cells. D, subset composition of NK cells.

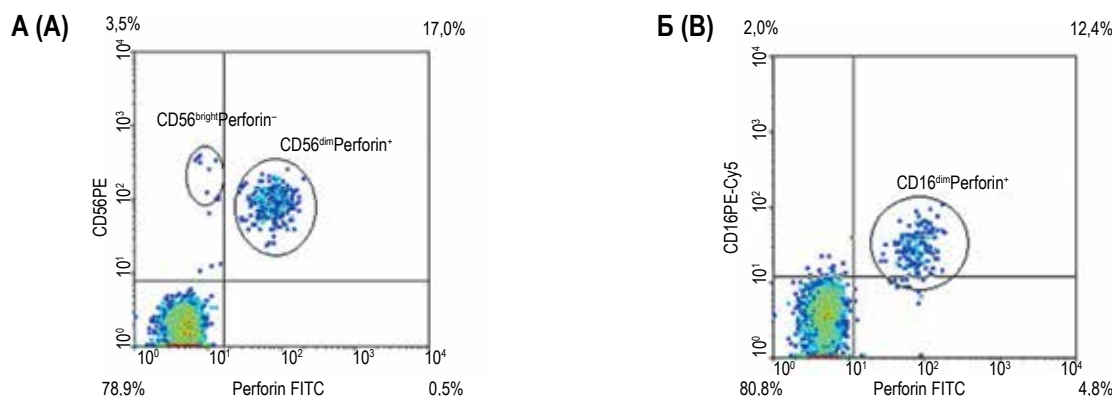


Рисунок 3. Исследование внутриклеточного содержания перфорина

Примечание. А – исследование содержания внутриклеточного перфорина в CD56⁺ клетках. Б – исследование содержания внутриклеточного перфорина в CD16⁺ клетках.

Figure 3. Intracellular perforin study

Note. A, intracellular perforin content in CD56⁺ cell population. B, contents of intracellular perforin in CD16⁺ cell population.

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

