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

Том 19, № 5. С. 483-650

2017

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

МЕДИЦИНСКАЯ ИММУНОЛОГИЯ

Данный выпуск реализован при финансовой поддержке Правительства Санкт-Петербурга

KEDRION
BIOPHARMA

Keep Life Flowing

И.Г.Вена

ИММУНОГЛОБУЛИН ЧЕЛОВЕКА НОРМАЛЬНЫЙ

РАСТВОР ДЛЯ ИНФУЗИЙ

ВЫСОКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ЭФФЕКТИВНОСТЬ

ВЫСОКАЯ ПЕРЕНОСИМОСТЬ

АНТИТЕЛА, КОТОРЫЕ ВСЕМ НУЖНЫ

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

сентябрь-октябрь

2017, том 19 **№ 5**

Основан в марте 1999 года

Главный редактор

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

Заместитель главного редактора

Тотолян Арег Артемович – доктор медицинских наук, профессор, 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 гибридомной 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

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

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

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 17.10.2017 г. Формат 60 x 90 1/8. Печать офсетная.
Усл. печ. л. 21. Тираж 2000 экз. (1-й завод – 1000 экз.)
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

RUSSIAN ASSOCIATION OF ALLERGOLOGISTS AND CLINICAL IMMUNOLOGISTS,
ST. PETERSBURG REGIONAL BRANCH
(SPb RAACI)

MEDICAL IMMUNOLOGY/ MEDITSINSKAYA IMMUNOLOGIYA

September-October
2017, volume 19 **No. 5**
Published since March 1999

Editor-in-Chief

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

Deputy Editor-in-Chief

Areg A. Totolian – PhD, MD, Professor, RAS 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 Postgratuate Medical Education, Department of Clinical Allergology, Chief, Moscow, Russian Federation

Kirill P. Kashkin – PhD, MD, Professor, RAS full member, Russian Academy of Postgratuate 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

Boris V. Pinegin – PhD, MD, Professor, Institute of Immunology, Department of Immunodiagnostics 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 Lasunskaia – 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 Planing, Department of Microbiology and Immunology, Chief, Seoul, South Korea

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

Managing Editor:
Natalia Rakitianskaja
E-mail: medimmun@spbraaci.ru

Translation editor:
Alexey B. Chukhlovin, PhD, MD

Editorial Office: phone/fax +7 812 233-08-58
Address for correspondence:
197136, St. Petersburg, P.O. Box 58.
Electronic version: www.mimmun.ru; www.elibrary.ru

© Medical Immunology

The Journal is registered at the North Western
Regional Administration for the Press Affairs
of the Russian Federation, March 26, 1999.
Certificate of registration PI № 77-15892
by the Ministry of Press, Television,
Broadcasting and Mass media of the Russian Federation, June 30, 2003.
Federal Service for Supervision of Communications, Information Technology and Mass Media (ROSKOMNADZOR)
Certificate on registration of mass media PI №FS77-60436, December 30, 2014

Chelovek Publishing House
199004, Russian Federation, St. Petersburg, Malyi persp. Vasilevsky Island, 26, office 2.
E-mail: mail@mirmed.ru
Phone/fax: (812) 325-25-64, 328-18-68.

Passed for printing 17.10.2017. Print format 60 x 90 1/8. Offset printing.
Printed sheets 21. 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

СОДЕРЖАНИЕ

Обзоры

Шмагель К.В., Шмагель Н.Г., Черешнев В.А.
АКТИВАЦИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ **489**

Корсунский И.А., Гордукова М.А., Козлов И.Г., Продеус А.П., Корсунский А.А.
КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ И ИХ РАННЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ **505**

Корнилова О.Г., Парамонова Е.В., Нечаев А.В., Кудашева Э.Ю., Борисевич И.В., Кишкурно Н.И.
МЕТОДЫ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ **513**

Оригинальные статьи

Старикова Э.А., Маммедова Дж.Т., Бурова Л.А., Соколов А.В., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С.
ВЛИЯНИЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА **521**

Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Мелащенко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцова Г.В., Селедцов В.И.
РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В НЕПОСРЕДСТВЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ **529**

Шевченко А.В., Прокофьев В.Ф., Коненков В.И., Черных В.В., Еремина А.В., Дудникова Л.В., Кашкина Н.Ю., Трунов А.Н.
СЕТЕВОЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ ЛОКУСОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ГЕНОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ (*TNFα-863, TNFα-308, TNFα-238*), ФАКТОРА РОСТА СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ (*VEGF-2578, VEGF+936*) И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (*MMP2-1306, MMP3-1171, MMP9-1569*) ПРИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ **537**

Соколов В.А., Лихванцева В.Г., Леванова О.Н., Никифоров А.А., Выгодин В.А.
ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЛЕЗЕ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА H (CFH) У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ **547**

Лихванцева В.Г., Афанасьев М.С., Руденко Е.А., Караулов А.В., Коростелева Е.В.
ПОИСК ТКАНЕЙ-МИШЕНЕЙ В ГЛАЗНОЙ ОРБИТЕ ДЛЯ АУТОИММУННОЙ АГРЕССИИ ТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИИ **557**

Кунц Т.А., Михайлова Е.С., Маринкин И.О., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И.
СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ И ОПУХОЛИ В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ **567**

Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А., Рагожина С.Е.
АНТИТЕЛА И АНТИ-АНТИТЕЛА К СТЕРОИДНЫМ ГОРМОНАМ И РИСК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ **577**

Гордеева Л.А., Оскорбина О.С., Воронина Е.Н., Соколова Е.А., Шаталина И.В., Оленникова Р.В., Нерсесян С.Л., Филипенко М.Л., Глушков А.Н.
АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ **585**

Куртасова Л.М., Шакина Н.А.
ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ **597**

Смольникова М.В., Фрейдин М.Б., Смирнова С.В.
ГЕНЫ ЦИТОКИНОВ КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ И НЕКОНТРОЛИРУЕМЫМ ТЕЧЕНИЕМ **605**

Иванов В.Б., Мосягин В.Д., Кудашева Э.Ю., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Борисевич И.В., Бондарев В.П.
МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА **615**

Краткие сообщения

Кенкишвили А.О., Албегова Д.З., Лаптев О.С., Павлова С.И., Козлов И.Г.
ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ КВЕРЦЕТИНА ДИГИДРАТА В МОДЕЛИ ОВА-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИИ У МЫШЕЙ **629**

Овсепян Л.М., Казарян Г.С., Зангинян А.В., Акопджанян А.А., Захарян Г.В., Петрек Мартин
ИЗУЧЕНИЕ АПОПТОЗА ИММУННЫХ КЛЕТОК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА **635**

Смирнова О.В., Цуканов В.В., Синяков А.А.
ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ, ХРОНИЧЕСКИМ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА **641**

Правила для авторов **647**

Авторский указатель **650**

Предметный указатель **650**

CONTENTS

Reviews

Shmagel K.V., Shmagel N.G., Chereshnev V.A.
IMMUNITY ACTIVATION IN HIV INFECTION **489**

Korsunskiy I.A., Gordukova M.A., Kozlov I.G., Prodeus A.P., Korsunskiy A.A.
CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY DISEASES (PID) AND EARLY DIAGNOSIS OPTIONS **505**

Kornilova O.G., Paramonova E.V., Nechaev A.V., Kudasheva E.Yu., Borisevich I.V., Kishkurno N.I.
HAEMAGGLUTINATION TECHNIQUES TO EVALUATE SPECIFIC SAFETY OF HUMAN INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS **513**

Original articles

Starikova E.A., Mammedova J.T., Burova L.A., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Freidlin I.S.
EFFECT OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ON CYTOSKELETON STRUCTURE AND MIGRATION ACTIVITY OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS **521**

Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gasatova N.D., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledtsova G.V., Seledtsov V.I.
A ROLE FOR INTERLEUKIN-8 IN DIRECT REGULATION OF T CELL FUNCTIONAL ACTIVITY **529**

Shevchenko A.V., Prokofyev V.F., Konenkov V.I., Chernykh V.V., Eremina A.V., Dudnikova L.V., Kashkina N.Yu., Trunov A.N.
NETWORK APPROACH TO ANALYSIS OF QUANTITATIVE TRAIT LOCI FOR TUMOR NECROSIS FACTOR (*TNFα-863, TNFα-308, TNFα-238*), VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (*VEGF-2578, VEGF+936*) AND MATRIX METALLOPROTEINASE (*MMP2-1306, MMP3-1171, MMP9-1569*) GENES IN AGERELATED MACULAR DEGENERATION **537**

Sokolov V.A., Likhvantseva V.G., Levanova O.N., Nikiforov A.A., Vygodin V.A.
EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN LACRIMAL FLUID AND GENE POLYMORPHISM OF COMPLEMENT FACTOR H (CFH) IN PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA **547**

Likhvantseva V.G., Afanasiev M.S., Rudenko E.A., Karaulov A.V., Korostelyova E.V.
SEARCH FOR TARGET TISSUE IN THE EYE ORBIT FOR AUTOIMMUNE AGGRESSION OF THYROID ANTIBODIES IN ENDOCRINE OPHTHALMOPATHY **557**

Kunts T.A., Mikhaylova E.S., Marinkin I.O., Varaksin N.A., Autenshlyus A.I.
COMPARATIVE ANALYSIS OF CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD IMMUNOCOMPETENT CELLS AND TUMOR IN DIFFERENT AGE GROUPS OF PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA **567**

Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E.
ANTIBODIES AND ANTI-ANTIBODIES TO STEROID HORMONES, AND BREAST CANCER RISK **577**

Gordeeva L.A., Oskorbina O.S., Voronina E.N., Sokolova E.A., Shatalina I.V., Olennikova R.V., Nersesyan S.L., Filipenko M.L., Glushkov A.N.
ASSOCIATION BETWEEN CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS AND RECURRENT MISCARRIAGE **585**

Kurtasova L.M., Shakina N.A.
FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AND METABOLIC CHANGES IN LYMPHOCYTES FROM PERIPHERAL BLOOD IN YOUNGER CHILDREN WITH RECURRENT OBSTRUCTIVE BRONCHITIS **597**

Smolnikova M.V., Freidin M.B., Smirnova S.V.
CYTOKINE GENES AS GENETIC MARKERS OF CONTROLLED AND UNCONTROLLED ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA **605**

Ivanov V.B., Mosyagin V.D., Kudasheva E.Yu., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Borisevitch I.V., Bondarev V.P.
METHODOLOGICAL APPROACHES TO EXPERT EVALUATION OF PRECLINICAL AND CLINICAL TRIALS OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN PRODUCTS **615**

Short communications

Kenkishvili A.O., Albegova D.Z., Laptev O.S., Pavlova S.I., Kozlov I.G.
STUDY OF QUERCETIN DIHYDRATE EFFECTS IN A MODEL OF OVA-INDUCED RESPIRATORY ALLERGY IN MICE **629**

Hovsepyan L.M., Kazaryan G.S., Zanginyan A.V., Akopdzhanyan A.A., Zakharyan G.V., Petrek M.
STUDY OF APOPTOSIS OF IMMUNE CELLS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS **635**

Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Sinyakov A.A.
FEATURES OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC GASTRITIS, CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS AND GASTRIC CANCER **641**

Instructions to Authors **647**

Author index **650**

Subject index **650**

АКТИВАЦИЯ ИММУНИТЕТА ПРИ ВИЧ-ИНФЕКЦИИ

Шмагель К.В.[1, 2], Шмагель Н.Г.[2, 3], Черешнев В.А.[2, 4]

[1] *ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН, г. Пермь, Россия*
[2] *ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*
[3] *ГКУЗ «Пермский краевой центр по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями», г. Пермь, Россия*
[4] *ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, г. Екатеринбург, Россия*

Резюме. Данный литературный обзор посвящен актуальной проблеме ВИЧ-инфекции – активации иммунитета. Иммунная активация в значительной мере определяет утрату $CD4^+$Т-лимфоцитов, приводит к развитию СПИД-ассоциированных и СПИД-неассоциированных заболеваний, а ее показатели являются весомыми прогностическими факторами исхода болезни. Активация при ВИЧ-инфекции захватывает клетки как врожденного, так и адаптивного иммунитета, ведет к усилению продукции провоспалительных цитокинов и повышению коагуляции крови. Причиной развития иммунной активации могут быть инфекционные агенты (ВИЧ, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр, вирус гепатита С), лимфопения и индуцированный ею процесс гомеостатической пролиферации лимфоцитов, транслокация микробов и их продуктов из кишечника, что связано с глубоким дефицитом $CD4^+$Т-клеток в *lamina propria* и нарушением проницаемости кишечного барьера. Другими факторами, поддерживающими процесс активации иммунитета, являются «сторонняя» активация Т-лимфоцитов, усиление оборота Т-клеток, развитие системного воспаления. В работе не только рассмотрены патогенетические механизмы развития ВИЧ-инфекции, связанные с синдромом иммунной активации, но также приведены различные лабораторные параметры, характеризующие ее проявление у инфицированных пациентов. Представлены значение и прогностическая роль этих параметров в оценке эффективности антиретровирусной терапии, формировании осложнений и негативного исхода инфекции.

Ключевые слова: ВИЧ-инфекция, иммунная активация, воспаление, лимфопения, цитокины, микробная транслокация

IMMUNITY ACTIVATION IN HIV INFECTION

Shmagel K.V.[a, b], Shmagel N.G.[b, c], Chereshnev V.A.[b, d]

[a] *Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Perm, Russian Federation*
[b] *Perm State University, Perm, Russian Federation*
[c] *Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious, Perm, Russian Federation*
[d] *Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences, Ekaterinburg, Russian Federation*

Abstract. This review article concerns a challenging problem of HIV infection, immune activation. The processes of immune activation largely determine $CD4^+$T cell depletion, leading to development of AIDS-associated and non-AIDS-related diseases. Immune activation indices are also strong predictors of the clinical outcome. Activation in HIV-infection affects both innate and adaptive immune cells, leads to increased proinflammatory cytokine production and blood coagulation. The reasons for immune activation may include different pathogens (HIV, cytomegalovirus, Epstein–Barr virus, hepatitis C virus), lymphopenia and lymphopenia-induced T lymphocyte homeostatic proliferation, transfer of microbial products from the gut, due to profound $CD4^+$T cell deficiency in *lamina propria* and altered permeability of intestinal barrier. Other factors that promote the process of immune activation are as follows: T lymphocyte "bystander" activation, increased T cell turnover, and systemic inflammation development. The review covers pathogenic mechanisms

Адрес для переписки:
Шмагель Константин Владимирович
ФГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН
614081, Россия, г. Пермь, ул. Голева, 13.
Тел.: 8 (342) 280-74-42.
Факс: 8 (342) 280-92-11.
E-mail: shmagel@iegm.ru

Address for correspondence:
Shmagel Konstantin V.
Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences
614081, Russian Federation, Perm, Goleva str., 13.
Phone: 7 (342) 280-74-42.
Fax: 7 (342) 280-92-11.
E-mail: shmagel@iegm.ru

Образец цитирования:
К.В. Шмагель, Н.Г. Шмагель, В.А. Черешнев «Активация иммунитета при ВИЧ-инфекции» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 489-504. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-489-504

© Шмагель К.В. и соавт., 2017

For citation:
K.V. Shmagel, N.G. Shmagel, V.A. Chereshnev "Immunity activation in HIV infection", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 489-504. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-489-504

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-489-504

HIV-infection associated with immune activation, like as description of different laboratory parameters characterizing its manifestations in HIV-infected patients. Significance and prognostic role of these parameters in assessing efficiency of antiretroviral therapy, development of complications, and adverse outcomes of infection are presented as well.

Keywords: HIV infection, immune activation, inflammation, lymphopenia, cytokines, microbial translocation

Работа поддержана грантом РНФ № 15-15-00016.

Накопленные к настоящему времени данные со всей очевидностью демонстрируют, что потеря $CD4^+$Т-клеток и развитие СПИДа у ВИЧ-инфицированных пациентов в значительной мере определяются иммунной активацией. Показатели активации иммунитета оказались явно весомее в прогнозировании наступления СПИДа [70, 212] и смерти [42, 84, 121] по сравнению с концентрацией вируса в крови. Это подтверждается сравнением параметров ВИЧ-1 и ВИЧ-2 обусловленных инфекций. Известно, что инфекции, вызванной ВИЧ-2, свойственны меньшая вирусная нагрузка, более медленное прогрессирование болезни и более высокий уровень $CD4^+$Т-лимфоцитов в крови [128]. Как выяснилось, главным различием между заболеваниями, индуцированными разными типами вируса, оказалась менее выраженная активация иммунитета у пациентов, инфицированных ВИЧ-2 [45, 82]. У природных хозяев вируса иммунодефицита обезьян (ВИО) – дымчатых мангобеев и зеленых африканских мартышек, для которых нетипично развитие иммунной активации [7, 174] – дефицит $CD4^+$Т-клеток не усугубляется в течение времени, а инфекция не реализуется в СПИД [33, 174].

Активация врожденного и адаптивного иммунитета начинается уже в острую фазу ВИЧ-инфекции [79, 177]. В хроническую фазу также наблюдается рост продукции провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, IL-8, IFNα), сывороточных маркеров воспаления (CRP, цистатин C, sCD14, D-димеры) и повышение коагуляции крови [43]. Интересно, что вместе с увеличением содержания провоспалительных медиаторов в крови у пациентов в хронический период отмечается подъем концентраций противовоспалительных цитокинов IL-10 и TGF-β1, которые могут быть предикторами развития СПИДа [203]. У зараженных ВИЧ субъектов, не принимающих противовирусную терапию, установлено повышение в крови провоспалительных моноцитов ($CD14^+CD16^+$) [54, 189], а у ВИО-инфицированных макак усиление оборота моноцитов было более весомым показателем в предсказании СПИДа, чем уровень вирусной нагрузки [83]. Важно также отметить, что гуморальные индикаторы воспаления, являющиеся прогностическими факторами в отношении не ассоциированных со СПИДом заболеваемости и смертности, имеют значимую корреляцию с параметрами активации моноцитов [205]. Среди других клеток врожденного иммунитета, на наш взгляд, следует обратить внимание на естественные киллеры. Известно, что NK-клетки у ВИЧ-инфицированных пациентов находятся в активированном состоянии [62, 147]. Уровень их активации возрастает с прогрессированием болезни и в большей степени касается цитолитической субпопуляции $CD56^{dim}CD16^+$ [114]. Авторы показали, что экспрессия на их поверхности CD38 коррелирует со снижением числа $CD4^+$Т-лимфоцитов, ростом активации Т-клеток (% $CD38^+HLA\text{-}DR^+$), повышением в крови концентрации sCD14 и развитием СПИДа.

При ВИЧ-инфекции наблюдается выраженная активация Т-лимфоцитов. Процесс затрагивает как $CD4^+$, так и $CD8^+$Т-клетки [115, 151]. Здесь необходимо подчеркнуть, что активированные $CD4^+$Т-лимфоциты являются источником поддержания ВИЧ- и ВИО-инфекции, в то время как покоящиеся $CD4^+$Т-клетки – нет [40, 178, 209]. Причиной системной иммунной активации могут быть различные факторы. Среди них выделяют сам ВИЧ, коинфицирующие агенты, гомеостатические механизмы, связанные с развитием лимфопении, микробную транслокацию из кишечника. Реакция на ВИЧ/ВИО способна реализоваться через TLR7/8 плазмацитоидных дендритных клеток [16, 134], а также другие рецепторы врожденного иммунитета [124, 207] с последующей передачей активационного сигнала Т-лимфоцитам. Часть Т-клеток стимулируется через Т-клеточный рецептор (TCR) после распознавания чужеродных пептидов в составе MHC дендроцитов. Это могут быть пептиды ВИЧ, цитомегаловируса и других вирусов, репликация которых усиливается на фоне иммунодефицита [95]. Вышесказанное подтверждается данными об уменьшении иммунной активации после снижения вирусной нагрузки на фоне проведения антиретровирусной терапии (АРТ) [60, 191].

Роль лимфопении

Развитие лимфопении при ВИЧ-инфекции сопровождается компенсаторной реакцией, направленной на восстановление численности лимфоцитов и получившей название «гомеостатической пролиферации» [188]. В настоящее время на основе экспериментальных работ, выполненных на мышах, выделяют два варианта гомеостатической пролиферации: медленный (одно деление клетки за 24-36 часов) и быстрый (одно деление клетки за 6-8 часов). Первый управляется фактором плотности клеточных элементов, второй – транслокацией кишечных бактерий [108,

138, 182]. Известно, что в ответ на лимфопению гомеостатической пролиферации подвергаются как наивные Т-лимфоциты, так и Т-клетки памяти. Наивные Т-лимфоциты характеризуются медленным типом гомеостатической пролиферации, который запускается двумя сигналами: молекулами MHC I и MHC II, соответственно, для $CD8^+$ и $CD4^+$Т-клеток [73, 129, 184, 186] и IL-7 [65, 185]. Экспансия Т-лимфоцитов памяти при лимфопении происходит быстрее [146]. Кроме того, для ее индукции, как правило, не требуются молекулы MHC [35, 143, 183]. Однако пролиферация $CD8^+$Т-клеток памяти существенно зависит от IL-15 [101].

На фоне развития ВИЧ-инфекции деление Т-лимфоцитов инициируется как гомеостатическими, так и вирусными факторами. При этом причиной пролиферации $CD4^+$Т-клеток являются и лимфопения, и присутствие патогена, а $CD8^+$Т-лимфоцитов, главным образом, – вирус [29]. Вместе с тем, показано, что степень зависимости разных субпопуляций $CD4^+$Т-клеток ВИЧ-инфицированных пациентов от двух представленных факторов может быть различной. Так, для наивных $CD4^+$Т-лимфоцитов ведущим драйвером митотической активации выступает дефицит общей численности $CD4^+$Т-клеток. На уровне $CD4^+$Т-лимфоцитов памяти пролиферация уже определяется влиянием и лимфопении, и вируса [30]. Следует отметить, что в отличие от гомеостатической пролиферации, протекающей в здоровом организме, при хронической вирусной инфекции регенерация дает короткоживущие клетки [80]. Кроме того, не все субпопуляции $CD4^+$Т-лимфоцитов способны восстанавливаться в равной степени [149].

Транслокация микробов

ВИЧ-инфекция вызывает выраженное опустошение лимфоидных структур пищеварительного тракта, что сопровождается нарушением эпителиального барьера кишечника [139, 171] и поступлением в кровоток микробов и их продуктов [110]. Повышение проницаемости кишечника обусловлено прямым деструктивным действием ВИЧ на кишечный эпителий [144] с последующим развитием воспаления и тканевого ремоделирования [176]. Еще одна причина патологических изменений эпителиального барьера – дефицит лимфоцитов, продуцирующих цитокины IL-17 и IL-22, участвующие в поддержании целостности эпителиальной выстилки [74, 109]. Оценка нарушенной проницаемости кишечника может быть проведена после перорального назначения какого-либо инертного соединения путем определения его концентрации в моче [156, 200]. Однако обычно для этой цели используют определение в крови или моче кишечного протеина, связывающего жирные кислоты (intestinal fatty acid binding protein – I-FABP) [78, 153]. I-FABP синтезируется в энтероцитах кишечника. Его концентрация в крови возрастает при повреждении слизистой пищеварительного тракта [105]. Еще один подход, используемый для определения состояния барьерной функции кишечника, опирается на измерение в кровотоке содержания различных микробных компонентов: липополисахарида (LPS) [28] и рибосомальной 16S ДНК [213], флагеллина [187].

Открытие роли микробной транслокации в активации иммунной системы внесло существенный вклад в понимание патогенеза ВИЧ-инфекции [22, 58, 126]. Вслед за этим появились публикации о том, что уровни LPS и свободного макрофагального рецептора CD14 (sCD14: способен связывать LPS) в крови ВИЧ-инфицированных пациентов могут быть использованы для прогноза развития заболевания и смертности [118, 127, 168]. Недавно на большой когорте ВИЧ-инфицированных пациентов, не получавших АРТ, были продемонстрированы ассоциативные связи между показателями LPS-зависимой активации иммунитета и уровнями в крови маркеров кишечного повреждения [155]. При этом зависимости между активацией иммунной системы и концентрацией вируса в крови обнаружено не было. Данные других исследователей, полученные при изучении индуцированной бактериями иммунной активации у больных с полностью подавленной вирусной нагрузкой, также подтверждают ее независимость от содержания ВИЧ в крови [99, 125, 126]. Предполагается, что активация иммунитета реализуется через Toll-подобные рецепторы (TLR) [25, 67, 148].

«Сторонняя» активация Т-лимфоцитов

Обычно доля активированных элементов среди $CD8^+$Т-лимфоцитов больше, чем среди $CD4^+$Т-клеток [55, 94], и показатель активации $CD8^+$Т-лимфоцитов является признанным предиктором негативного развития ВИЧ-инфекции. Например, исследования, проведенные у мужчин-гомосексуалистов, продемонстрировали ассоциативные связи между повышением численности $CD8^+CD38^+HLA\text{-}DR^+$Т-клеток, снижением количества $CD4^+$Т-лимфоцитов и появлением СПИДа [69]. Логично предположить, что их активация (как и пролиферация) определяется присутствием вируса. Однако доля ВИЧ-специфичных элементов среди циркулирующих $CD8^+$Т-клеток составляет 6-8% [18, 136], а относительное содержание $CD8^+$Т-лимфоцитов с фенотипом $CD38^+HLA\text{-}DR^+$ может достигать 65% [55]. Причины столь высокого уровня активации $CD8^+$Т-клеток пока остаются недостаточно ясными. Относительное понимание этого явления наступило с развитием идеи «сторонней» (bystander) активации Т-лимфоцитов. Она подразумевает возникновение фенотипических или функциональных изменений Т-клеток, реализуемых в обход TCR.

Сторонняя активация часто наблюдается при вирусных инфекциях [193]. Ее проявления можно зафиксировать *in vitro* и *in vivo*. В очаге вирусного воспаления, например, отмечается присутствие Т-лимфоцитов различной специфичности [36, 38, 150]. Важная роль цитокинов в сторонней активации Т-клеток является общепризнанной. Они способны оказывать самостоятельное влияние на Т-лимфоциты [34, 104, 196, 214]. Так, инъекция IFNαβ мышам с нарушением синтеза молекул MHC-I вызывает пролиферацию $CD8^+$Т-клеток [192], что свидетельствует о возможности индукции сигнала без участия TCR. Однако, как выяснилось в дальнейшем, пролиферативный эффект IFN-I в отношении $CD8^+$Т-лимфоцитов памяти реализуется не прямо, а через индукцию синтеза IL-15 (сам IFN-I подавляет деление клеток *in vitro*) [214]. Авторы также показали, что влияние IL-15 распространяется на $CD8^+$, но не на $CD4^+$Т-клетки. У субъектов с ВИЧ-инфекцией была продемонстрирована повышенная продукция IL-12 и IL-15 [19], а затем показано, что дендритные клетки больных стимулируют $CD8^+$Т-лимфоциты в обход TCR-сигнала, синтезируя высокие концентрации IL-15 [14]. Кроме того, в опытах *in vitro* исследователи обнаружили, что IL-15 способен вызывать пролиферацию $CD8^+$Т-клеток и экспрессию на их поверхности активационных маркеров (CD38 и HLA-DR), но не обладает этими эффектами в отношении $CD4^+$Т-лимфоцитов. Еще одним фактором, определяющим формирование сторонней активации, является присутствие в организме коинфицирующих агентов, таких как цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр, аденовирус, вирус гриппа [14, 48]. Однако механизмы активирующего влияния при коинфекциях остаются нераскрытыми. Таким образом, если причины повышенной активации $CD8^+$Т-клеток по сравнению с $CD4^+$Т-клетками при ВИЧ-инфекции можно считать установленными, то пути их реализации пока недостаточно ясны.

Усиление оборота Т-клеток

Активация $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клеток часто сопровождается их гибелью: феномен, получивший название «индуцированная активацией смерть клетки» (ИАСК) [24, 76]. ИАСК может реализоваться через стимуляцию TCR и без нее, с использованием и без использования CD95, а также с участием различных цитокинов [23]. Установлена также роль рецепторов врожденного иммунитета в этом феномене. Добавление различных TLR-лигандов к Т-лимфоцитам здоровых доноров индуцировало экспрессию CD38 на $CD4^+$ и $CD8^+$Т-клетках в краткосрочных (менее суток) культурах [67]. Длительное культивирование (в течение 7 дней) с TLR-лигандами приводило к выраженной экспрессии CD69 на $CD8^+$Т-лимфоцитах и Ki-67 на $CD4^+$Т-клетках. При этом $CD8^+$ элементы сохраняли жизнеспособность, а $CD4^+$Т-лимфоциты, вступившие в деление, погибали. Представленные данные показывают, каким образом активированные микробными продуктами $CD4^+$Т-клетки могут гибнуть у больных, инфицированных ВИЧ. Рост доли умирающих лимфоцитов вызывает включение компенсаторных гомеостатических механизмов и приводит к повышению обмена иммунокомпетентных клеток.

Работы, посвященные исследованию темпов оборота Т-лимфоцитов при ВИЧ-инфекции, обычно свидетельствуют об ускорении обмена Т-клеток. Это касается как $CD4^+$, так и $CD8^+$ субпопуляции [86, 111, 132, 140, 167]. На основе экспрессии маркера пролиферации Ki-67 было рассчитано время удвоения Т-клеток у ВИЧ-инфицированных пациентов [167]. Оно оказалось в 5 раз короче при сравнении с аналогичным показателем, полученным для неинфицированных субъектов. При этом средний дневной оборот $CD4^+$ и $CD8^+$Т-лимфоцитов в группе с ВИЧ-инфекцией был повышен в 2 и 6 раз соответственно. В основном это объясняется резким сокращением (менее 1/3) времени полужизни Т-клеток обеих субпопуляций [86]. Важно также подчеркнуть, что регенерация Т-лимфоцитов происходит преимущественно за счет пролиферации Т-клеток памяти. Митотическая активность наивных клеток (особенно CD4-позитивных) выражена слабо [49, 167]. Кроме того, необходимо отметить, что продуктивная функция $CD8^+$Т-клеток у ВИЧ-инфицированных людей существенно превышает таковую $CD4^+$Т-лимфоцитов [86], чем объясняется развитие $CD4^+$Т-лимфопении. Назначение АРТ приводит к увеличению продуктивного потенциала $CD4^+$Т-лимфоцитов [86, 132] и постепенному увеличению их численности.

Системное воспаление

Помимо активации иммунокомпетентных клеток, ВИЧ-инфекция характеризуется развитием хронического воспаления, что вносит свой вклад в патогенез данного заболевания. В острую стадию наблюдается активная продукция провоспалительных цитокинов: IFNα, IFNγ, TNFα, IL-6, IL-15, IP-10 [177]. Воспалительные явления и протромботические сдвиги сохраняются также в хроническую фазу инфекции у АРТ-наивных пациентов [52, 145, 161], что повышает риск развития сердечно-сосудистых заболеваний [53, 194]. У многих больных, несмотря на проведение АРТ, в крови сохраняются повышенные концентрации CRP, D-димеров, IL-6, sCD14 [9, 44, 113]. В связи с тем, что многие маркеры системного воспаления не только имеют диагностическое значение, но также отражают роль различных патогенетических механизмов в развитии ВИЧ-инфекции, на наш взгляд, требуется более подробное их рассмотрение.

TNFα и растворимые рецепторы sTNFR-I и sTNFR-II

TNFα является провоспалительным цитокином, который продуцируется различными клетками и занимает ведущее среди цитокинов положение в системе защиты организма [2]. Он реализует свою активность через клеточные рецепторы TNFR-I (CD120a) и TNFR-II (CD120b). Растворимые формы рецепторов (sTNFR-I и sTNFR-II) конститутивно высвобождаются с поверхности клеток и присутствуют в циркуляции [157]. Их уровень в крови повышается после стимуляции TNF [98, 116] и может увеличиваться при различных заболеваниях [47]. Следует отметить, что TNFα, с одной стороны, достаточно быстро исчезает из кровотока, с другой – находится в крови в комплексе с sTNFR. Это создает проблемы его детекции [56, 102]. В то же время растворимые рецепторы к TNFα высокостабильны, а концентрации sTNFR-I и sTNFR-II хорошо коррелируют с уровнем их лиганда [10, 210]. Измерение концентраций TNF-рецепторов в сыворотке крови ВИЧ-инфицированных пациентов показало, что уровни sTNFR-I и sTNFR-II у них были повышены относительно показателей неинфицированных людей, и этот рост определялся тяжестью и клинической стадией заболевания (наиболее высокие значения были обнаружены у больных СПИДом) [71]. Эти исследователи также отметили обратные корреляции между содержанием в крови тест-субстанций и численностью $CD4^+$Т-клеток. Среди двух вариантов растворимых рецепторов sTNFR-II, по-видимому, является более чувствительным индикатором воспаления, так как у субъектов с бессимптомным носительством ВИЧ его содержание в отличие от содержания sTNFR-I значимо превышает уровень контроля [71, 88]. В дальнейшем было установлено, что при ВИЧ-инфекции оба параметра отражают состояние системной иммунной активации. Их концентрации коррелировали с уровнями IFNγ и β_2-микроглобулина в крови, а также неоптерина в моче [211]. Другие авторы продемонстрировали прямую связь содержания растворимых TNF-рецепторов с концентрациями в крови неоптерина и антигена p24 ВИЧ-1 [11]. И, наконец, было обнаружено, что уровень sTNFR-II в крови ВИЧ-инфицированных пациентов является предиктором наступления СПИДа, превосходящим по прогностической значимости показатели содержания β_2-микроглобулина и $CD4^+$Т-лимфоцитов в крови [72]. Таким образом, можно заключить, что концентрации sTNFR-I и sTNFR-II у ВИЧ-инфицированных субъектов отражают развитие системного воспаления, а сведения об их росте усиливают негативный прогноз в развитии заболевания.

Интерлейкин-6

IL-6 является провоспалительным цитокином. Во время инфекций вырабатывается преимущественно макрофагами; индуцирует продукцию реактантов острой фазы [199]. У ВИЧ-инфицированных пациентов, как принимающих, так и не принимающих АРТ, уровни IL-6 повышены [103, 145]. Увеличенное содержание IL-6 у носителей ВИЧ связано с повышенным риском наступления смерти от сердечно-сосудистых заболеваний [96, 113]. На большом количестве пациентов (около 10000) было обнаружено, что подъем уровня IL-6 ассоциируется с повышенной репликацией вируса, низким до начала терапии уровнем $CD4^+$Т-клеток, сниженным показателем клубочковой фильтрации, большей массой тела, пожилым возрастом [21]. Ранее было показано, что вспомогательный протеин ВИЧ Vpr индуцирует продукцию человеческими макрофагами IL-6, который в свою очередь активирует репликацию вируса в латентно инфицированных клетках [92]. В работе также отмечено, что индукция Vpr синтеза IL-6 требует дополнительного сигнала через TLR4 (рецептор для LPS). Приведенные данные позволяют несколько поиному оценить роль микробной транслокации в ВИЧ-инфекции. В этом плане заслуживает внимания исследование [172], в котором авторы не обнаружили корреляции между уровнем IL-6 в плазме крови и концентрацией РНК ВИЧ в крови. Но при этом уровень IL-6 коррелировал с содержанием sCD14 (корецептор LPS).

Повышенные концентрации IL-6, наблюдаемые при ВИЧ-инфекции, также отмечены у людей преклонного возраста [57]. Это позволяет провести параллель между ВИЧ-инфекцией и процессом старения. Помимо роста уровня IL-6 оба состояния характеризуются накоплением «стареющих» клеток, истощением иммунных ресурсов, активацией иммунитета [8, 43, 85]. IL-6 обладает прямым активирующим эффектом в отношении Т-лимфоцитов [208], а также стимулирует их дифференцировку в Th2-клетки [46]. Исходя из этого, можно предположить, что хроническая стимуляция, индуцированная цитокином, вызовет старение и истощение иммунокомпетентных клеток. Например, известно, что у пожилых людей с высокими уровнями IL-6 по сравнению с сопоставимыми по возрасту субъектами, но с меньшими концентрациями IL-6, существенно снижен ответ на вакцинацию против гриппа [195]. Таким образом, длительная продукция IL-6 у ВИЧ-инфицированных пациентов дает негативные эффекты как в отношении СПИД-неассоциированных заболеваний, так и в отношении развития самой ВИЧ-инфекции.

Растворимый рецептор sCD14

CD14 является корецептором, который экспрессируется преимущественно на моноцитах и макрофагах. Совместно с TLR4 он распознает LPS. Известно, что после активации моноциты путем ферментативного расщепления сбрасывают со своей мембраны CD14 [15]. Активирующим

факторами могут выступать провоспалительные цитокины и TLR-лиганды [173]. Содержание sCD14 в плазме крови больных с ВИЧ-инфекцией значительно увеличено относительно показателей здоровых людей [119, 135]. Концентрации sCD14 в крови ВИЧ-инфицированных пациентов имеют прогностическую ценность в предсказании летальности; они коррелируют с уровнями IL-6, CRP, D-димеров, сывороточного амилоида А [168]. У зараженных больных также наблюдается ассоциация значений sCD14 с плотностью интимы каротидных артерий независимо от стадии ВИЧ-инфекции и состава препаратов, входящих в АРТ [107]. Кроме того, было показано, что повышенные уровни sCD14 у ВИЧ-позитивных субъектов связаны с неврологическими нарушениями [103]. Следует отметить, что sCD14 не может быть однозначно интерпретирован как продукт макрофагов. При развитии воспаления он продуцируется гепатоцитами в качестве реактанта острой фазы [13].

Растворимый рецептор sCD163

CD163 является макрофагальным рецептором-мусорщиком, опосредующим удаление гаптоглобин-гемоглобиновых комплексов [112]. Активация моноцитов и макрофагов вызывает высвобождение CD163 с клеточной поверхности и превращение его в растворимую форму (sCD163) [141]. Сбрасывание рецепторов стимулируется LPS, а также лигандами TLR2 и TLR5 [87, 201]. Концентрация sCD163 в плазме крови ВИЧ-инфицированных пациентов существенно повышена по сравнению с соответствующим показателем ВИЧ-серонегативных субъектов и умеренно снижается через три месяца после назначения АРТ, оставаясь выше контрольного уровня [5, 26]. Кроме того, у пациентов с ВИЧ-инфекцией отмечены прямые ассоциации sCD163 с показателями активации моноцитов [205] и лимфоцитов [26, 205], выявлена связь между повышенным содержанием растворимого макрофагального рецептора и развитием атеросклероза [61, 133, 180]. Исследование уровней провоспалительных факторов в крови женщин, инфицированных ВИЧ, и пожилых женщин без ВИЧ-инфекции обнаружило, что их концентрации повышены в обеих группах. Однако неинфицированные женщины, имевшие содержание sCD163, соответствующее уровню зараженных пациенток были на 14 лет старше [130]. Эти данные предполагают, что хроническая активация мононуклеарных фагоцитов ведет к ускоренному старению иммунной системы.

Моноциты периферической крови продуцируют относительно небольшие количества CD163, но экспрессия рецептора усиливается при дифференцировке моноцитов в тканевые макрофаги [90, 142]. Важно отметить, что мощными индукторами экспрессии CD163 являются противовоспалительные факторы: глюкокортикоиды [169, 198] и IL-10 [181, 204]. Примечательно также, что тканевые макрофаги с высокой плотностью CD163 обнаруживаются в терминальную фазу воспалительного процесса [215]. Кроме того, известно, что sCD163 способен подавлять активацию человеческих Т-лимфоцитов [64, 91]. Это привело исследователей к выводу о том, что выраженная экспрессия гаптоглобиновых рецепторов наблюдается преимущественно на альтернативно активированных макрофагах [3, 59]. Этим клеткам свойственно подавление избыточного воспалительного процесса, участие в заживлении ран, ангиогенезе [131]. Дифференцировка моноцитов в альтернативно активированные макрофаги, экспрессирующие CD163, может происходить под влиянием регуляторных $CD4^+$Т-лимфоцитов ($CD25^+FoxP3^+$). При этом усиление экспрессии гаптоглобиновых рецепторов зависит от IL-10, но не от IL-4 или IL-13 [190]. Все вышесказанное свидетельствует о том, что повышение sCD163 в крови ВИЧ-инфицированных пациентов, хотя и является отражением воспалительного процесса, представляет собой реакцию, направленную на его подавление и включение регенераторных процессов.

Неоптерин

Неоптерин является побочным продуктом метаболизма гуанозин 5'-трифосфата (ГТФ). ГТФ расщепляется под действием фермента ГТФ-циклогидролазы I. Эта реакция наблюдается в активированных макрофагах, дендритных клетках, эндотелиоцитах и ряде других клеток, после стимуляции IFNγ и, в меньшей степени IFNα и IFNβ [17, 89]. Экспрессия мРНК ГТФ-циклогидролазы I может быть индуцирована IFNγ через STAT-систему, или TNFα – через нуклеарный фактор NF-κB [93]. В результате расщепления ГТФ образуется 7,8-дигидронеоптерин-трифосфат. Следующий этап метаболизма: конвертация 7,8-дигидронеоптерин-трифосфата в 6-пировоилтетрагидроптерин. Однако фермент, ответственный за эту реакцию, слабо продуцируется в макрофагах человека и приматов [202]. В результате 7,8-дигидронеоптерин-трифосфат окисляется в неоптерин, который в дальнейшем не подвергается метаболизму и выводится с мочой [89]. Исходя из того, что 1) неоптерин образуется в макрофагах, 2) основным источником IFNγ в организме служат Th1-клетки [41] и NK-клетки [152], 3) ведущими продуцентами TNFα являются макрофаги и активированные Т-лимфоциты [170], можно заключить следующее. Неоптерин является индикатором активации клеточно-опосредованного иммунитета. С этих позиций обычно оценивается его значение при ВИЧ-инфекции.

Уровни неоптерина в крови ВИЧ-инфицированных пациентов, как правило, бывают повышены относительно соответствующих

значений здоровых людей [50, 137, 197]. Рост концентрации неоптерина начинается в острую фазу ВИЧ-инфекции вместе с увеличением концентрации вирусного антигена p24. Затем в период сероконверсии его содержание падает, но не достигает нормальных значений. В дальнейшем уровень метаболита неуклонно повышается и достигает максимума в терминальную стадию инфекции [206]. Определение концентрации неоптерина может быть использовано для прогноза развития заболевания [137]. Также было показано, что содержание неоптерина у пациентов с числом $CD4^+$Т-клеток крови < 200 мкл $^{-1}$ достоверно превышало его уровень у ВИЧ-инфицированных субъектов с количеством $CD4^+$Т-лимфоцитов > 200 мкл $^{-1}$ [31]. Кроме того, больные, у которых при стимуляции Т-клеток антигенами была нарушена продукция IL-2, имели более высокие уровни неоптерина, по сравнению с теми, у кого не было отмечено дефицита синтеза цитокина [66]. Таким образом, увеличение концентрации неоптерина в крови является негативным прогностическим фактором при ВИЧ-инфекции. Применение АРТ приводит к снижению его содержания у больных относительно уровня инфицированных субъектов, не получающих лечения [4, 32].

CXCL10 (IP-10)

Индуцированный интерфероном-γ протеин 10 (interferon-γ-inducible protein 10 [IP-10]) секретируется различными типами клеток: моноцитами, дендритными клетками, нейтрофилами, эозинофилами, эпителиальными и эндотелиальными клетками, фибробластами, кератиноцитами, астроцитами и стромальными клетками в ответ на стимуляцию IFNγ [123, 164, 165]. Общим рецептором для CXCL9, CXCL10 и CXCL11 является CXCR3 [77]. Воздействуя на клетки, несущие CXCR3, IP-10 может вызывать их хемотаксис, апоптоз, пролиферацию [120]. CXCL10 – хемоаттрактант для различных иммунокомпетентных клеток: активированных Th1-лимфоцитов, макрофагов, дендритных клеток, γδТ-клеток, естественных киллеров [20, 97, 122, 154, 164]. Следовательно, IP-10 представляет собой провоспалительный хемокин, который ассоциируется с развитием инфекций, наличием хронического воспаления, отторжением трансплантата, возникновением аутоиммунных процессов [6, 39, 166].

При ВИЧ-инфекции концентрация IP-10 в крови существенно увеличивается [106, 159, 163]. При этом CXCL10 коррелирует с показателем вирусной нагрузки как в острую [117], так и хроническую стадию заболевания [75]. В культуре *in vitro* было установлено, что главным источником IP-10 при стимуляции клеток периферической крови ВИЧ-1 являются моноциты и дендритные клетки [175]. Те же авторы показали, что сигнал на индукцию синтеза хемокина, по-видимому, реализуется через TLR7/9, так как использование антагониста этих рецепторов блокировало синтез IP-10 в присутствии вируса. Проведение АРТ вызывает снижение уровня CXCL10 в крови, однако он остается повышенным относительно показателя здоровых людей [81]. Уменьшение содержания IP-10 при лечении коррелирует с ростом численности $CD4^+$Т-лимфоцитов крови [160, 179].

D-димеры

Свертывание крови приводит к образованию сгустка, основой которого является фибрин. Распад фибрина под влиянием тромбина, фактора XIIIa и плазмина сопровождается высвобождением D-димеров [1]. Таким образом, D-димеры являются индикаторами активации свертывающей системы крови и развития тромбоза. Следует также отметить, что процессы воспаления и свертывания крови тесно связаны между собой [63]. Известно, что при ВИЧ-инфекции существенно повышены как D-димеры, так и CRP, и IL-6 [12, 68, 145]. Коагулопатические сдвиги у ВИЧ-инфицированных пациентов проявляются не только ростом концентрации D-димеров, но также снижением в плазме активности антитромбина, протеина С и протеина S [100, 158]. Увеличение концентрации D-димеров в крови имеет выраженную ассоциацию со смертностью больных [113]. Их повышенный уровень является предиктором развития сердечно-сосудистых заболеваний, но при этом не связан с возникновением оппортунистических инфекций [51, 162]. Подавление виремии при назначении АРТ ведет к снижению содержания D-димеров в крови [27, 100].

Подводя итог, можно заключить, что ВИЧ-инфекция вызывает выраженную активацию как врожденного, так и адаптивного иммунитета, индуцирует и поддерживает в организме системное воспаление, что сопровождается нарушением процессов свертывания крови и развитием протромботических сдвигов. Это приводит не только к усилению репликации вируса и гибели $CD4^+$Т-лимфоцитов, но и к увеличению риска возникновения и отягощения СПИД-неассоциированных заболеваний, в первую очередь, болезней сосудов и сердца, что вносит ощутимый вклад в уровень смертности ВИЧ-инфицированных пациентов [37].

Список литературы / References

1. Adam S.S., Key N.S., Greenberg C.S. D-dimer antigen: current concepts and future prospects. *Blood, 2009, Vol. 113, no. 13, pp. 2878-2887.*

2. Aggarwal B.B., Natarajan K. Tumor necrosis factors: developments during the last decade. *Eur. Cytokine Netw., 1996, Vol. 7, no. 2, pp. 93-124.*

3. Akila P., Prashant V., Suma M.N., Prashant S.N., Chaitra T.R. CD163 and its expanding functional repertoire. *Clin. Chim. Acta, 2012, Vol. 413, no. 7-8, pp. 669-674.*

4. Amirayan-Chevillard N., Tissot-Dupont H., Obadia Y., Gallais H., Mege J.L., Capo C. Highly active antiretroviral therapy (HAART) and circulating markers of immune activation: specific effect of HAART on neopterin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol., 2000, Vol. 7, no. 5, pp. 832-834.*

5. Ananworanich J., Kerr S.J., Jaimulwong T., Vibol U., Hansudewechakul R., Kosalaraksa P., Ngampiyaskul C., Kanjanavanit S., Wongsawat J., Luesomboon W., Apornpong T., Soulas C., Paul R., Ruxrungtham K., Puthanakit T. Soluble CD163 and monocyte populations in response to antiretroviral therapy and in relationship with neuropsychological testing among HIV-infected children. *J. Virus Erad., 2015, Vol. 1, no. 3, pp. 196-202.*

6. Antonelli A., Ferrari S.M., Giuggioli D., Ferrannini E., Ferri C., Fallahi P. Chemokine (C-X-C motif) ligand (CXCL)10 in autoimmune diseases. *Autoimmun. Rev., 2014, Vol. 13, no. 3, pp. 272-280.*

7. Apetrei C., Sumpter B., Souquiere S., Chahroudi A., Makuwa M., Reed P., Ribeiro R.M., Pandrea I., Roques P., Silvestri G. Immunovirological analyses of chronically simian immunodeficiency virus SIVmnd-1-and SIVmnd-2-infected mandrills (Mandrillus sphinx). *J. Virol., 2011, Vol. 85, no. 24, pp. 13077-13087.*

8. Appay V., Kelleher A.D. Immune activation and immune aging in HIV infection. *Curr. Opin. HIV AIDS, 2016, Vol. 11, no. 2, pp. 242-249.*

9. Armah K.A., McGinnis K., Baker J., Gibert C., Butt A.A., Bryant K.J., Goetz M., Tracy R., Oursler K.K., Rimland D., Crothers K., Rodriguez-Barradas M., Crystal S., Gordon A., Kraemer K., Brown S., Gerschenson M., Leaf D.A., Deeks S.G., Rinaldo C., Kuller L.H., Justice A., Freiberg M. HIV status, burden of comorbid disease, and biomarkers of inflammation, altered coagulation, and monocyte activation. *Clin. Infect. Dis, 2012, Vol. 55, no. 1, pp. 126-136.*

10. Aukrust P., Liabakk N.B., Muller F., Lien E., Espevik T., Froland S.S. Serum levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) and soluble TNF receptors in human immunodeficiency virus type 1 infection-correlations to clinical, immunologic, and virologic parameters. *J. Infect. Dis., 1994, Vol. 169, no. 2, pp. 420-424.*

11. Aukrust P., Liabakk N.B., Muller F., Espevik T. Activation of tumor necrosis factor alpha system in HIV-1 infection: association with markers of immune activation. *Infection, 1995, Vol. 23, no. 1, pp. 9-15.*

12. Baker J., Ayenew W., Quick H., Hullsiek K.H., Tracy R., Henry K., Duprez D., Neaton J.D. High-density lipoprotein particles and markers of inflammation and thrombotic activity in patients with untreated HIV infection. *J. Infect. Dis., 2010, Vol. 201, no. 2, pp. 285-292.*

13. Bas S., Gauthier B.R., Spenato U., Stingelin S., Gabay C. CD14 is an acute-phase protein. *J. Immunol., 2004, Vol. 172, no. 7, pp. 4470-4479.*

14. Bastidas S., Graw F., Smith M.Z., Kuster H., Gunthard H.F., Oxenius A. $CD8^+$ T cells are activated in an antigen-independent manner in HIV-infected individuals. *J. Immunol., 2014, Vol. 192, no. 4, pp. 1732-1744.*

15. Bazil V., Strominger J.L. Shedding as a mechanism of down-modulation of CD14 on stimulated human monocytes. *J. Immunol., 1991, Vol. 147, no. 5, pp. 1567-1574.*

16. Beignon A.S., McKenna K., Skoberne M., Manches O., DaSilva I., Kavanagh D.G., Larsson M., Gorelick R.J., Lifson J.D., Bhardwaj N. Endocytosis of HIV-1 activates plasmacytoid dendritic cells via toll-like receptor-viral RNA interactions. *J. Clin. Invest., 2005, Vol. 115, no. 11, pp. 3265-3275.*

17. Berdowska A., Zwirska-Korczala K. Neopterin measurement in clinical diagnosis. *J. Clin. Pharm. Ther., 2001, Vol. 26, no. 5, pp. 319-329.*

18. Betts M.R., Ambrozak D.R., Douek D.C., Bonhoeffer S., Brenchley J.M., Casazza J.P., Koup R.A., Picker L.J. Analysis of total human immunodeficiency virus (HIV)-specific CD4 (+) and CD8 (+) T-cell responses: relationship to viral load in untreated HIV infection. *J. Virol., 2001, Vol. 75, no. 24, pp. 11983-11991.*

19. Biancotto A., Grivel J.C., Iglehart S.J., Vanpouille C., Lisco A., Sieg S.F., Debernardo R., Garate K., Rodriguez B., Margolis L.B., Lederman M.M. Abnormal activation and cytokine spectra in lymph nodes of people chronically infected with HIV-1. *Blood, 2007, Vol. 109, no. 10, pp. 4272-4279.*

20. Bonecchi R., Bianchi G., Bordignon P.P., D'Ambrosio D., Lang R., Borsatti A., Sozzani S., Allavena P., Gray P.A., Mantovani A., Sinigaglia F. Differential expression of chemokine receptors and chemotactic responsiveness of type 1 T helper cells (Th1s) and Th2s. *J. Exp. Med., 1998, Vol. 187, no. 1, pp. 129-134.*

21. Borges A.H., O'Connor J.L., Phillips A.N., Ronsholt F.F., Pett S., Vjecha M.J., French M.A., Lundgren J.D., Insight S., Groups E.S., the S.S.C. Factors Associated With Plasma IL-6 Levels During HIV Infection. *J. Infect. Dis., 2015, Vol. 212, no. 4, pp. 585-595.*

22. Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W., Asher T.E., Silvestri G., Rao S., Kazzaz Z., Bornstein E., Lambotte O., Altmann D., Blazar B.R., Rodriguez B., Teixeira-Johnson L., Landay A., Martin J.N., Hecht F.M., Picker L.J., Lederman M.M., Deeks S.G., Douek D.C. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat. Med., 2006, Vol. 12, no. 12, pp. 1365-1371.*

23. Brenner D., Krammer P.H., Arnold R. Concepts of activated T cell death. *Crit. Rev. Oncol. Hematol., 2008, Vol. 66, no. 1, pp. 52-64.*

24. Budd R.C. Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol., 2001, Vol. 13, no. 3, pp. 356-362.*

25. Bukh A.R., Melchjorsen J., Offersen R., Jensen J.M.B., Toft L., Stovring H., Ostergaard L., Tolstrup M., Sogaard O.S. Endotoxemia Is Associated with Altered Innate and Adaptive Immune Responses in Untreated HIV-1 Infected Individuals. *PloS One, 2011, Vol. 6, e21275.* doi: 10.1371/journal.pone.0021275.

26. Burdo T.H., Lentz M.R., Autissier P., Krishnan A., Halpern E., Letendre S., Rosenberg E.S., Ellis R.J., Williams K.C. Soluble CD163 made by monocyte/macrophages is a novel marker of HIV activity in early and chronic infection prior to and after anti-retroviral therapy. *J. Infect. Dis., 2011, Vol. 204, no. 1, pp. 154-163.*

27. Calmy A., Gayet-Ageron A., Montecucco F., Nguyen A., Mach F., Burger F., Ubolyam S., Carr A., Ruxungtham K., Hirschel B., Ananworanich J., Grp S.S. HIV increases markers of cardiovascular risk: results from a randomized, treatment interruption trial. *AIDS, 2009, Vol. 23, no. 8, pp. 929-939.*

28. Caradonna L., Amati L., Magrone T., Pellegrino N.M., Jirillo E., Caccavo D. Enteric bacteria, lipopolysaccharides and related cytokines in inflammatory bowel disease: biological and clinical significance. *J. Endotoxin Res., 2000, Vol. 6, no. 3, pp. 205-214.*

29. Catalfamo M., Di Mascio M., Hu Z., Srinivasula S., Thaker V., Adelsberger J., Rupert A., Baseler M., Tagaya Y., Roby G., Rehm C., Follmann D., Lane H.C. HIV infection-associated immune activation occurs by two distinct pathways that differentially affect CD4 and CD8 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2008, Vol. 105, no. 50, pp. 19851-19856.*

30. Catalfamo M., Wilhelm C., Tcheung L., Proschan M., Friesen T., Park J.H., Adelsberger J., Baseler M., Maldarelli F., Davey R., Roby G., Rehm C., Lane C. CD4 and CD8 T cell immune activation during chronic HIV infection: roles of homeostasis, HIV, type I IFN, and IL-7. *J. Immunol., 2011, Vol. 186, no. 4, pp. 2106-2116.*

31. Chadha S., Bhalla P., Gautam H., Chakravarti A., Saini S., Anuradha S., Dewan R. Utility of serum neopterin and serum IL-2 receptor levels to predict absolute CD4 T lymphocyte count in HIV infected cases. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis., 2013, Vol. 2013, pp. 143648.*

32. Chagan-Yasutan H., Saitoh H., Ashino Y., Arikawa T., Hirashima M., Li S., Usuzawa M., Oguma S., EF O.T., Obi C.L., Hattori T. Persistent elevation of plasma osteopontin levels in HIV patients despite highly active antiretroviral therapy. *Tohoku J. Exp. Med., 2009, Vol. 218, no. 4, pp. 285-292.*

33. Chahroudi A., Bosinger S.E., Vanderford T.H., Paiardini M., Silvestri G. Natural SIV Hosts: *Showing AIDS the Door. Science, 2012, Vol. 335, no. 6073, pp. 1188-1193.*

34. Chakir H., Lam D.K.Y., Lemay A.M., Webb J.R. 'Bystander polarization' of $CD4^+$ T cells: activation with high-dose IL-2 renders naive T cells responsive to IL-12 and/or IL-18 in the absence of TCR ligation. *Eur. J. Immunol., 2003, Vol. 33, no. 7, pp. 1788-1798.*

35. Chalasani G., Dai Z.H., Konieczny B.T., Baddoura F.K., Lakkis F.G. Recall and propagation of allospecific memory T cells independent of secondary lymphoid organs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, Vol. 99, no. 9, pp. 6175-6180.*

36. Chapman T.J., Castrucci M.R., Padnick R.C., Bradley L.M., Topham D.J. Antigen-specific and non-specific CD4 (+) T cell recruitment and proliferation during influenza infection. *Virology, 2005, Vol. 340, no. 2, pp. 296-306.*

37. Chastain D.B., Henderson H., Stover K.R. Epidemiology and management of antiretroviral-associated cardiovascular disease. *Open AIDS J, 2015, Vol. 9, pp. 23-37.*

38. Chen A.M., Khanna N., Stohlman S.A., Bergmann C.C. Virus-specific and bystander CD8 T cells recruited during virus-induced encephalomyelitis. *J. Virol., 2005, Vol. 79, no. 8, pp. 4700-4708.*

39. Chen L.J., Lv J., Wen X.Y., Niu J.Q. CXC chemokine IP-10: a key actor in liver disease? *Hepatol. Int., 2013, Vol. 7, no. 3, pp. 798-804.*

40. Chou C.S., Ramilo O., Vitetta E.S. Highly purified CD25(-) resting T cells cannot be infected de novo with HIV-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1997, Vol. 94, no. 4, pp. 1361-1365.*

41. Damsker J.M., Hansen A.M., Caspi R.R. Th1 and Th17 cells: adversaries and collaborators. *Ann. N. Y. Acad. Sci., 2010, Vol. 1183, pp. 211-221.*

42. Deeks S.G., Kitchen C.M., Liu L., Guo H., Gascon R., Narvaez A.B., Hunt P., Martin J.N., Kahn J.O., Levy J., McGrath M.S., Hecht F.M. Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent $CD4^+$ T-cell changes independent of viral load. *Blood, 2004, Vol. 104, no. 4, pp. 942-947.*

43. Deeks S.G. HIV infection, inflammation, immunosenescence, and aging. *Annu. Rev. Med., 2011, Vol. 62, pp. 141-155.*

44. Deeks S.G., Tracy R., Douek D.C. Systemic effects of inflammation on health during chronic HIV infection. *Immunity, 2013, Vol. 39, no. 4, pp. 633-645.*

45. Devadas K., Biswas S., Haleyurgirisetty M., Wood O., Ragupathy V., Lee S., Hewlett I. Analysis of Host Gene Expression Profile in HIV-1 and HIV-2 Infected T-Cells. *PloS One, 2016, Vol. 11, e0147421.*

46. Diehl S., Rincon M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol. Immunol., 2002, Vol. 39, no. 9, pp. 531-536.*

47. Diez-Ruiz A., Tilz G.P., Zangerle R., Baier-Bitterlich G., Wachter H., Fuchs D. Soluble receptors for tumour necrosis factor in clinical laboratory diagnosis. *Eur. J. Haematol., 1995, Vol. 54, no. 1, pp. 1-8.*

48. Doisne J.M., Urrutia A., Lacabaratz-Porret C., Goujard C., Meyer L., Chaix M.L., Sinet M., Venet A. $CD8^+$ T cells specific for EBV, cytomegalovirus, and influenza virus are activated during primary HIV infection. *J. Immunol., 2004, Vol. 173, no. 4, pp. 2410-2418.*

49. Douek D.C., Betts M.R., Hill B.J., Little S.J., Lempicki R., Metcalf J.A., Casazza J., Yoder C., Adelsberger J.W., Stevens R.A., Baseler M.W., Keiser P., Richman D.D., Davey R.T., Koup R.A. Evidence for increased T cell turnover and decreased thymic output in HIV infection. *J. Immunol., 2001, Vol. 167, no. 11, pp. 6663-6668.*

50. Dukes C.S., Matthews T.J., Rivadeneira E.D., Weinberg J.B. Neopterin production by HIV-1-infected mononuclear phagocytes. *J. Leuk. Biol., 1994, Vol. 56, no. 5, pp. 650-653.*

51. Duprez D.A., Kuller L.H., Tracy R., Otvos J., Cooper D.A., Hoy J., Neuhaus J., Paton N.I., Friis-Moller N., Lampe F., Liappis A.P., Neaton J.D., Grp I.S.S. Lipoprotein particle subclasses, cardiovascular disease and HIV infection. *Atherosclerosis, 2009, Vol. 207, no. 2, pp. 524-529.*

52. Duprez D.A., Neuhaus J., Kuller L.H., Tracy R., Belloso W., De Wit S., Drummond F., Lane H.C., Ledergerber B., Lundgren J., Nixon D., Paton N.I., Prineas R.J., Neaton J.D., Grp I.S.S. Inflammation, Coagulation and Cardiovascular Disease in HIV-Infected Individuals. *PloS One, 2012, Vol. 7, e44454.*

53. Durand M., Sheehy O., Baril J.G., Lelorier J., Tremblay C.L. Association Between HIV Infection, Antiretroviral Therapy, and Risk of Acute Myocardial Infarction: A Cohort and Nested Case-Control Study Using Quebec's Public Health Insurance Database. *JAIDS, 2011, Vol. 57, no. 3, pp. 245-253.*

54. Dutertre C.A., Amraoui S., DeRosa A., Jourdain J.P., Vimeux L., Goguet M., Degrelle S., Feuillet V., Liovat A.S., Muller-Trutwin M., Decroix N., Deveau C., Meyer L., Goujard C., Loulergue P., Launay O., Richard Y., Hosmalin A. Pivotal role of M-DC8 (+) monocytes from viremic HIV-infected patients in TNF alpha overproduction in response to microbial products. *Blood, 2012, Vol. 120, no. 11, pp. 2259-2268.*

55. Eggena M.P., Barugahare B., Okello M., Mutyala S., Jones N., Ma Y.F., Kityo C., Mugyenyi P., Cao H. T cell activation in HIV-seropositive Ugandans: Differential associations with viral load, CD4 (+) T cell depletion, and coinfection. *J. Infect. Dis., 2005, Vol. 191, no. 5, pp. 694-701.*

56. Engelberts I., Moller A., Schoen G.J.M., Vanderlinden C.J., Buurman W.A. Evaluation of measurement of human TNF in plasma by ELISA. *Lymphokine Cytok. Res., 1991, Vol. 10, no. 1-2, pp. 69-76.*

57. Ershler W.B., Sun W.H., Binkley N., Gravenstein S., Volk M.J., Kamoske G., Klopp R.G., Roecker E.B., Daynes R.A., Weindruch R. Interleukin-6 and aging: blood levels and mononuclear cell production increase with advancing age and *in vitro* production is modifiable by dietary restriction. *Lymphokine Cytok. Res., 1993, Vol. 12, no. 4, pp. 225-230.*

58. Estes J.D., Harris L.D., Klatt N.R., Tabb B., Pittaluga S., Paiardini M., Barclay G.R., Smedley J., Pung R., Oliveira K.M., Hirsch V.M., Silvestri G., Douek D.C., Miller C.J., Haase A.T., Lifson J., Brenchley J.M. Damaged intestinal epithelial integrity linked to microbial translocation in pathogenic simian immunodeficiency virus infections. *PloS Pathog., 2010, Vol. 6, e1001052.* doi: 10.1371/journal.ppat.1001052.

59. Etzerodt A., Moestrup S.K. CD163 and inflammation: biological, diagnostic, and therapeutic aspects. *Antioxid. Redox Signal, 2013, Vol. 18, no. 17, pp. 2352-2363.*

60. Evans T.G., Bonnez W., Soucier H.R., Fitzgerald T., Gibbons D.C., Reichman R.C. Highly active antiretroviral therapy results in a decrease in CD8 (+) T cell activation and preferential reconstitution of the peripheral CD4 (+) T cell population with memory rather than naive cells. *Antivir. Res., 1998, Vol. 39, no. 3, pp. 163-173.*

61. Fitch K.V., Srinivasa S., Abbara S., Burdo T.H., Williams K.C., Eneh P., Lo J., Grinspoon S.K. Noncalcified coronary atherosclerotic plaque and immune activation in HIV-infected women. *J. Infect. Dis., 2013, Vol. 208, no. 11, pp. 1737-1746.*

62. Fogli M., Costa P., Murdaca G., Setti M., Mingari M.C., Moretta L., Moretta A., De Maria A. Significant NK cell activation associated with decreased cytolytic function in peripheral blood of HIV-1-infected patients. *Eur. J. Immunol., 2004, Vol. 34, no. 8, pp. 2313-2321.*

63. Foley J.H., Conway E.M. Cross talk pathways between coagulation and inflammation. *Circ. Res., 2016, Vol. 118, no. 9, pp. 1392-1408.*

64. Frings W., Dreier J., Sorg C. Only the soluble form of the scavenger receptor CD163 acts inhibitory on phorbol ester-activated T-lymphocytes, whereas membrane-bound protein has no effect. *FEBS Lett., 2002, Vol. 526, no. 1-3, pp. 93-96.*

65. Fry T.J., Mackall C.L. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J. Immunol., 2005, Vol. 174, no. 11, pp. 6571-6576.*

66. Fuchs D., Shearer G.M., Boswell R.N., Clerici M., Reibnegger G., Werner E.R., Zajac R.A., Wachter H. Increased serum neopterin in patients with HIV-1 infection is correlated with reduced *in vitro* interleukin-2 production. *Clin. Exp. Immunol., 1990, Vol. 80, no. 1, pp. 44-48.*

67. Funderburg N., Luciano A.A., Jiang W., Rodriguez B., Sieg S.F., Lederman M.M. Toll-like receptor ligands induce human T cell activation and death, a model for HIV pathogenesis. *PLoS One, 2008, Vol. 3, e1915.* doi: 10.1371/journal.pone.0001915.

68. Funderburg N.T., Mayne E., Sieg S.F., Asaad R., Jiang W., Kalinowska M., Luciano A.A., Stevens W., Rodriguez B., Brenchley J.M., Douek D.C., Lederman M.M. Increased tissue factor expression on circulating monocytes in chronic HIV infection: relationship to *in vivo* coagulation and immune activation. *Blood, 2010, Vol. 115, no. 2, pp. 161-167.*

69. Giorgi J.V., Detels R. T-cell subset alterations in HIV-infected homosexual men: NIAID Multicenter AIDS cohort study. *Clin. Immunol. Immunopathol., 1989, Vol. 52, no. 1, pp. 10-18.*

70. Giorgi J.V., Hultin L.E., McKeating J.A., Johnson T.D., Owens B., Jacobson L.P., Shih R., Lewis J., Wiley D.J., Phair J.P., Wolinsky S.M., Detels R. Shorter survival in advanced human immunodeficiency virus type 1 infection is more closely associated with T lymphocyte activation than with plasma virus burden or virus chemokine coreceptor usage. *J. Infect. Dis., 1999, Vol. 179, no. 4, pp. 859-870.*

71. Godfried M.H., Vanderpoll T., Jansen J., Romijin J.A., Schattenkerk J.K.M.E., Endert E., Vandeventer S.J.H., Sauerwein H.P. Soluble Receptors for Tumor-Necrosis-Factor – a Putative Marker of Disease Progression in HIV-Infection. *AIDS, 1993, Vol. 7, no. 1, pp. 33-36.*

72. Godfried M.H., Vanderpoll T., Weverling G.J., Mulder J.W., Jansen J., Vandeventer S.J.H., Sauerwein H.P. Soluble Receptors for Tumor-Necrosis-Factor as Predictors of Progression to Aids in Asymptomatic Human-Immunodeficiency-Virus Type-1 Infection. *J. Infect. Dis., 1994, Vol. 169, no. 4, pp. 739-745.*

73. Goldrath A.W., Bevan M.J. Low-affinity ligands for the TCR drive proliferation of mature CD8 (+) T cells in lymphopenic hosts. *Immunity, 1999, Vol. 11, no. 2, pp. 183-190.*

74. Gordon S.N., Cervasi B., Odorizzi P., Silverman R., Aberra F., Ginsberg G., Estes J.D., Paiardini M., Frank I., Silvestri G. Disruption of intestinal $CD4^+$ T cell homeostasis is a key marker of systemic $CD4^+$ T cell activation in HIV-infected individuals. *J. Immunol., 2010, Vol. 185, no. 9, pp. 5169-5179.*

75. Gray C.M., Hong H.A., Young K., Lewis D.A., Fallows D., Manca C., Kaplan G. Plasma interferon-gamma-inducible protein 10 can be used to predict viral load in HIV-1-infected individuals. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr., 2013, Vol. 63, no. 3, pp. e115-116.*

76. Green D.R., Droin N., Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev., 2003, Vol. 193, pp. 70-81.*

77. Groom J.R., Luster A.D. CXCR3 in T cell function. *Exp. Cell. Res., 2011, Vol. 317, no. 5, pp. 620-631.*

78. Grootjans J., Thuijls G., Verdam F., Derikx J.P., Lenaerts K., Buurman W.A. Non-invasive assessment of barrier integrity and function of the human gut. *World J. Gastrointest. Surg., 2010, Vol. 2, no. 3, pp. 61-69.*

79. Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Sousa A.E., Victorino R.M., Paul W.E. $CD4^+$ T-cell depletion in HIV infection: are we closer to understanding the cause? *Nat. Med., 2002, Vol. 8, no. 4, pp. 319-323.*

80. Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Paul W.E., Picker L.J. Pathogenesis of HIV infection: what the virus spares is as important as what it destroys. *Nat. Med., 2006, Vol. 12, no. 3, pp. 289-295.*

81. Guihot A., Dentone C., Assoumou L., Parizot C., Calin R., Seang S., Soulie C., Marcelin A.G., Calvez V., Autran B., Katlama C., Costagliola D., Carcelain G. Residual immune activation in combined antiretroviral therapy-treated patients with maximally suppressed viremia. *AIDS, 2016, Vol. 30, no. 2, pp. 327-330.*

82. Hanson A., Sarr A.D., Shea A., Jones N., Mboup S., Kanki P., Cao H.Y. Distinct profile of T cell activation in HIV type 2 compared to HIV type 1 infection: Differential mechanism for immunoprotection. *AIDS Res. Hum. Retrov., 2005, Vol. 21, no. 9, pp. 791-798.*

83. Hasegawa A., Liu H.N., Ling B.H., Borda J.T., Alvarez X., Sugimoto C., Vinet-Oliphant H., Kim W.K., Williams K.C., Ribeiro R.M., Lackner A.A., Veazey R.S., Kuroda M.J. The level of monocyte turnover predicts disease progression in the macaque model of AIDS. *Blood, 2009, Vol. 114, no. 14, pp. 2917-2925.*

84. Hazenberg M.D., Otto S.A., van Benthem B.H., Roos M.T., Coutinho R.A., Lange J.M., Hamann D., Prins M., Miedema F. Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS. *AIDS, 2003, Vol. 17, no. 13, pp. 1881-1888.*

85. Hearps A.C., Martin G.E., Angelovich T.A., Cheng W.J., Maisa A., Landay A.L., Jaworowski A., Crowe S.M. Aging is associated with chronic innate immune activation and dysregulation of monocyte phenotype and function. *Aging Cell, 2012, Vol. 11, no. 5, pp. 867-875.*

86. Hellerstein M., Hanley M.B., Cesar D., Siler S., Papageorgopoulos C., Wieder E., Schmidt D., Hoh R., Neese R., Macallan D., Deeks S., McCune J.M. Directly measured kinetics of circulating T lymphocytes in normal and HIV-1-infected humans. *Nat. Med., 1999, Vol. 5, no. 1, pp. 83-89.*

87. Hintz K.A., Rassias A.J., Wardwell K., Moss M.L., Morganelli P.M., Pioli P.A., Givan A.L., Wallace P.K., Yeager M.P., Guyre P.M. Endotoxin induces rapid metalloproteinase-mediated shedding followed by up-regulation of the monocyte hemoglobin scavenger receptor CD163. *J. Leuk. Biol., 2002, Vol. 72, no. 4, pp. 711-717.*

88. Hober D., Benyoucef S., Delannoy A.S., deGroote D., Ajana F., Mouton Y., Wattre P. High plasma level of soluble tumor necrosis factor receptor type II (sTNFRII) in asymptomatic HIV-1-infected patients. *Infection, 1996, Vol. 24, no. 3, pp. 213-217.*

89. Hoffmann G., Wirleitner B., Fuchs D. Potential role of immune system activation-associated production of neopterin derivatives in humans. *Inflamm. Res., 2003, Vol. 52, no. 8, pp. 313-321.*

90. Hogger P., Dreier J., Droste A., Buck F., Sorg C. Identification of the integral membrane protein RM3/1 on human monocytes as a glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family (CD163). *J. Immunol., 1998, Vol. 161, no. 4, pp. 1883-1890.*

91. Hogger P., Sorg C. Soluble CD163 inhibits phorbol ester-induced lymphocyte proliferation. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 2001, Vol. 288, no. 4, pp. 841-843.*

92. Hoshino S., Konishi M., Mori M., Shimura M., Nishitani C., Kuroki Y., Koyanagi Y., Kano S., Itabe H., Ishizaka Y. HIV-1 Vpr induces TLR4/MyD88-mediated IL-6 production and reactivates viral production from latency. *J. Leuk. Biol., 2010, Vol. 87, no. 6, pp. 1133-1143.*

93. Huang A., Zhang Y.Y., Chen K., Hatakeyama K., Keaney J.F., Jr. Cytokine-stimulated GTP cyclohydrolase I expression in endothelial cells requires coordinated activation of nuclear factor-kappaB and Stat1/Stat3. *Circ. Res., 2005, Vol. 96, no. 2, pp. 164-171.*

94. Hunt P.W., Brenchley J., Sinclair E., McCune J.M., Roland M., Page-Shafer K., Hsue P., Emu B., Krone M., Lampiris H., Douek D., Martin J.N., Deeks S.G. Relationship between T cell activation and CD4 (+) T cell count in HIV-seropositive individuals with undetectable plasma HIV RNA levels in the absence of therapy. *J. Infect. Dis., 2008, Vol. 197, no. 1, pp. 126-133.*

95. Hunt P.W., Martin J.N., Sinclair E., Epling L., Teague J., Jacobson M.A., Tracy R.P., Corey L., Deeks S.G. Valganciclovir reduces T cell activation in HIV-infected individuals with incomplete CD4 (+) T cell recovery on antiretroviral therapy. *J. Infect. Dis., 2011, Vol. 203, no. 10, pp. 1474-1483.*

96. Jalbert E., Crawford T.Q., D'Antoni M.L., Keating S.M., Norris P.J., Nakamoto B.K., Seto T., Parikh N.I., Shikuma C.M., Ndhlovu L.C., Barbour J.D. IL-1β enriched monocytes mount massive IL-6 responses to common inflammatory triggers among chronically HIV-1 infected adults on stable anti-retroviral therapy at risk for cardiovascular disease. *PloS One, 2013, Vol. 8, e75500.* doi: 10.1371/journal.pone.0075500.

97. Janatpour M.J., Hudak S., Sathe M., Sedgwick J.D., McEvoy L.M. Tumor necrosis factor-dependent segmental control of MIG expression by high endothelial venules in inflamed lymph nodes regulates monocyte recruitment. *J. Exp. Med., 2001, Vol. 194, no. 9, pp. 1375-1384.*

98. Jansen J., Vanderpoll T., Levi M., Tencate H., Gallati H., Tencate J.W., Vandeventer S.J.H. Inhibition of the Release of Soluble Tumor-Necrosis-Factor Receptors in Experimental Endotoxemia by an Antitumor Necrosis Factor-Alpha Antibody. *J. Clin. Immunol., 1995, Vol. 15, no. 1, pp. 45-50.*

99. Jiang W., Lederman M.M., Hunt P., Sieg S.F., Haley K., Rodriguez B., Landay A., Martin J., Sinclair E., Asher A.I., Deeks S.G., Douek D.C., Brenchley J.M. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the

magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J. Infect. Dis., 2009, Vol. 199, no. 8, pp. 1177-1185.*

100. Jong E., Louw S., Meijers J.C.M., de Kruif M.D., ten Cate H., Buller H.R., Mulder J.W., van Gorp E.C.M. The hemostatic balance in HIV-infected patients with and without antiretroviral therapy: partial restoration with antiretroviral therapy. *AIDS Patient Care Stds, 2009, Vol. 23, no. 12, pp. 1001-1007.*

101. Judge A.D., Zhang X.H., Fujii H., Surh C.D., Sprent J. Interleukin 15 controls both proliferation and survival of a subset of memory-phenotype CD8 (+) T cells. *J. Exp. Med., 2002, Vol. 196, no. 7, pp. 935-946.*

102. Kalinkovich A., Engelmann H., Harpaz N., Burstein R., Barak V., Kalickman I., Wallach D., Bentwich Z. Elevated serum levels of soluble tumor necrosis factor receptors (sTNF-R) in patients with HIV-infection. *Clin. Exp. Immunol., 1992, Vol. 89, no. 3, pp. 351-355.*

103. Kamat A., Lyons J.L., Misra V., Uno H., Morgello S., Singer E.J., Gabuzda D. Monocyte activation markers in cerebrospinal fluid associated with impaired neurocognitive testing in advanced HIV infection. *JAIDS, 2012, Vol. 60, no. 3, pp. 234-243.*

104. Kamath A.T., Sheasby C.E., Tough D.F. Dendritic cells and NK cells stimulate bystander T cell activation in response to TLR agonists through secretion of IFN-alpha beta and IFN-gamma. *J. Immunol., 2005, Vol. 174, no. 2, pp. 767-776.*

105. Kanda T., Fujii H., Tani T., Murakami H., Suda T., Sakai Y., Ono T., Hatakeyama K. Intestinal fatty acid-binding protein is a useful diagnostic marker for mesenteric infarction in humans. *Gastroenterology, 1996, Vol. 110, no. 2, pp. 339-343.*

106. Keating S.M., Golub E.T., Nowicki M., Young M., Anastos K., Crystal H., Cohen M.H., Zhang J., Greenblatt R.M., Desai S., Wu S., Landay A.L., Gange S.J., Norris P.J., Women's Interagency H.I.V.S. The effect of HIV infection and HAART on inflammatory biomarkers in a population-based cohort of women. *AIDS, 2011, Vol. 25, no. 15, pp. 1823-1832.*

107. Kelesidis T., Kendall M.A., Yang O.O., Hodis H.N., Currier J.S. Biomarkers of Microbial Translocation and Macrophage Activation: Association With Progression of Subclinical Atherosclerosis in HIV-1 Infection. *J. Infect. Dis., 2012, Vol. 206, no. 10, pp. 1558-1567.*

108. Kieper W.C., Troy A., Burghardt J.T., Ramsey C., Lee J.Y., Jiang H.Q., Dummer W., Shen H., Cebra J.J., Surh C.D. Cutting edge: Recent immune status determines the source of antigens that drive homeostatic T cell expansion. *J. Immunol., 2005, Vol. 174, no. 6, pp. 3158-3163.*

109. Klatt N.R., Estes J.D., Sun X., Ortiz A.M., Barber J.S., Harris L.D., Cervasi B., Yokomizo L.K., Pan L., Vinton C.L., Tabb B., Canary L.A., Dang Q., Hirsch V.M., Alter G., Belkaid Y., Lifson J.D., Silvestri G., Milner J.D., Paiardini M., Haddad E.K., Brenchley J.M. Loss of mucosal CD103$^+$ DCs and IL-17$^+$ and IL-22$^+$ lymphocytes is associated with mucosal damage in SIV infection. *Mucosal Immunol., 2012, Vol. 5, no. 6, pp. 646-657.*

110. Klatt N.R., Funderburg N.T., Brenchley J.M. Microbial translocation, immune activation, and HIV disease. *Trends Microbiol., 2013, Vol. 21, no. 1, pp. 6-13.*

111. Kovacs J.A., Lempicki R.A., Sidorov I.A., Adelsberger J.W., Herpin B., Metcalf J.A., Sereti I., Polis M.A., Davey R.T., Tavel J., Falloon J., Stevens R., Lambert L., Dewar R., Schwartzentruber D.J., Anver M.R., Baseler M.W., Masur H., Dimitrov D.S., Lane H.C. Identification of dynamically distinct subpopulations of T lymphocytes that are differentially affected by HIV. *J. Exp. Med., 2001, Vol. 194, no. 12, pp. 1731-1741.*

112. Kristiansen M., Graversen J.H., Jacobsen C., Sonne O., Hoffman H.J., Law S.K., Moestrup S.K. Identification of the haemoglobin scavenger receptor. *Nature, 2001, Vol. 409, no. 6817, pp. 198-201.*

113. Kuller L.H., Tracy R., Belloso W., De Wit S., Drummond F., Lane H.C., Ledergerber B., Lundgren J., Neuhaus J., Nixon D., Paton N.I., Neaton J.D., Group I.S.S. Inflammatory and coagulation biomarkers and mortality in patients with HIV infection. *PLoS Med., 2008, Vol. 5, e203.* doi: 10.1371/journal.pmed.0050203.

114. Kuri-Cervantes L., de Oca G.S.M., Avila-Rios S., Hernandez-Juan R., Reyes-Teran G. Activation of NK cells is associated with HIV-1 disease progression. *J. Leuk. Biol., 2014, Vol. 96, no. 1, pp. 7-16.*

115. Lackner A.A., Lederman M.M., Rodriguez B. HIV pathogenesis: the host. *Cold Spring Harb. Perspect. Med., 2012, Vol. 2, a007005.* doi: 10.1101/cshperspect.a007005.

116. Lantz M., Malik S., Slevin M.L., Olsson I. Infusion of tumor necrosis factor (TNF) causes an increase in circulating TNF-binding protein in humans. *Cytokine, 1990, Vol. 2, no. 6, pp. 402-406.*

117. Lee S., Chung Y.S., Yoon C.H., Shin Y., Kim S., Choi B.S., Kim S.S. Interferon-inducible protein 10 (IP-10) is associated with viremia of early HIV-1 infection in Korean patients. *J. Med. Virol., 2015, Vol. 87, no. 5, pp. 782-789.*

118. Leon A., Leal L., Torres B., Lucero C., Inciarte A., Arnedo M., Plana M., Vila J., Gatell J.M., Garcia F. Association of microbial translocation biomarkers with clinical outcome in controllers HIV-infected patients. *AIDS, 2015, Vol. 29, no. 6, pp. 675-681.*

119. Lien E., Aukrust P., Sundan A., Muller F., Froland S.S., Espevik T. Elevated levels of serum-soluble CD14 in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection: Correlation to disease progression and clinical events. *Blood, 1998, Vol. 92, no. 6, pp. 2084-2092.*

120. Liu M., Guo S., Hibbert J.M., Jain V., Singh N., Wilson N.O., Stiles J.K. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev, 2011, Vol. 22, no. 3, pp. 121-130.*

121. Liu Z., Cumberland W.G., Hultin L.E., Kaplan A.H., Detels R., Giorgi J.V. CD8 (+) T-lymphocyte activation in HIV-1 disease reflects an aspect of pathogenesis distinct from viral burden and immunodeficiency. *J. Acq. Immun. Def. Synd., 1998, Vol. 18, no. 4, pp. 332-340.*

122. Loetscher M., Gerber B., Loetscher P., Jones S.A., Piali L., Clark-Lewis I., Baggiolini M., Moser B. Chemokine receptor specific for IP10 and Mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes. *J. Exp. Med., 1996, Vol. 184, no. 3, pp. 963-969.*

123. Luster A.D., Ravetch J.V. Biochemical characterization of a gamma interferon-inducible cytokine (IP-10). *J. Exp. Med., 1987, Vol. 166, no. 4, pp. 1084-1097.*

124. Manel N., Hogstad B., Wang Y., Levy D.E., Unutmaz D., Littman D.R. A cryptic sensor for HIV-1 activates antiviral innate immunity in dendritic cells. *Nature, 2010, Vol. 467, no. 7312, pp. 214-217.*

125. Marchetti G., Gori A., Casabianca A., Magnani M., Franzetti F., Clerici M., Perno C.F., Monforte A., Galli M., Meroni L. Comparative analysis of T-cell turnover and homeostatic parameters in HIV-infected patients with discordant immune-virological responses to HAART. *AIDS, 2006, Vol. 20, no. 13, pp. 1727-1736.*

126. Marchetti G., Bellistri G.M., Borghi E., Tincati C., Ferramosca S., La Francesca M., Morace G., Gori A., Monforte A.D. Microbial translocation is associated with sustained failure in $CD4^+$ T-cell reconstitution in HIV-infected patients on long-term highly active antiretroviral therapy. *AIDS, 2008, Vol. 22, no. 15, pp. 2035-2038.*

127. Marchetti G., Cozzi-Lepri A., Merlini E., Bellistri G.M., Castagna A., Galli M., Verucchi G., Antinori A., Costantini A., Giacometti A., di Caro A., Monforte A.D., Grp I.F.S. Microbial translocation predicts disease progression of HIV-infected antiretroviral-naive patients with high CD4 (+) cell count. *AIDS, 2011, Vol. 25, no. 11, pp. 1385-1394.*

128. Marlink R., Kanki P., Thior I., Travers K., Eisen G., Siby T., Traore I., Hsieh C.C., Dia M.C., Gueye E., Hellinger J., Gueyendiaye A., Sankale J.L., Ndoye I., Mboup S., Essex M. Reduced rate of disease development after HIV-2 infection as compared to HIV-1. *Science, 1994, Vol. 265, no. 5178, pp. 1587-1590.*

129. Martin B., Bourgeois C., Dautigny N., Lucas B. On the role of MHC class II molecules in the survival and lymphopenia-induced proliferation of peripheral CD4 (+) T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2003, Vol. 100, no. 10, pp. 6021-6026.*

130. Martin G.E., Gouillou M., Hearps A.C., Angelovich T.A., Cheng A.C., Lynch F., Cheng W.J., Paukovics G., Palmer C.S., Novak R.M., Jaworowski A., Landay A.L., Crowe S.M. Age-associated changes in monocyte and innate immune activation markers occur more rapidly in HIV infected women. *PLoS One, 2013, Vol. 8, no. 1, e55279.* doi: 10.1371/journal.pone.0055279.

131. Martinez F.O., Helming L., Gordon S. Alternative activation of macrophages: an immunologic functional perspective. *Annu. Rev. Immunol., 2009, Vol. 27, pp. 451-483.*

132. McCune J.M., Hanley M.B., Cesar D., Halvorsen R., Hoh R., Schmidt D., Wieder E., Deeks S., Siler S., Neese R., Hellerstein M. Factors influencing T-cell turnover in HIV-1-seropositive patients. *J. Clin. Invest., 2000, Vol. 105, no. 5, pp. R1-8.*

133. McKibben R.A., Margolick J.B., Grinspoon S., Li X., Palella F.J., Jr., Kingsley L.A., Witt M.D., George R.T., Jacobson L.P., Budoff M., Tracy R.P., Brown T.T., Post W.S. Elevated levels of monocyte activation markers are associated with subclinical atherosclerosis in men with and those without HIV infection. *J. Infect. Dis., 2015, Vol. 211, no. 8, pp. 1219-1228.*

134. Meier A., Alter G., Frahm N., Sidhu H., Li B., Bayhi A., Teigen N., Streeck H., Stellbrink H.J., Hellman J., van Lunzen J., Altfeld M. MyD88-dependent immune activation mediated by human immunodeficiency virus type 1-encoded toll-like receptor ligands. *J. Virol., 2007, Vol. 81, no. 15, pp. 8180-8191.*

135. Mendez-Lagares G., Romero-Sanchez M.C., Ruiz-Mateos E., Genebat M., Ferrando-Martinez S., Munoz-Fernandez M.A., Pacheco Y.M., Leal M. Long-term suppressive combined antiretroviral treatment does not normalize the serum level of soluble CD14. *J. Infect. Dis., 2013, Vol. 207, no. 8, pp. 1221-1225.*

136. Migueles S.A., Laborico A.C., Shupert W.L., Sabbaghian M.S., Rabin R., Hallahan C.W., Van Baarle D., Kostense S., Miedema F., McLaughlin M., Ehler L., Metcalf J., Liu S.Y., Connors M. HIV-specific CD8 (+) T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nat. Immunol., 2002, Vol. 3, no. 11, pp. 1061-1068.*

137. Mildvan D., Spritzler J., Grossberg S.E., Fahey J.L., Johnston D.M., Schock B.R., Kagan J. Serum neopterin, an immune activation marker, independently predicts disease progression in advanced HIV-1 infection. *Clin. Infect. Dis., 2005, Vol. 40, no. 6, pp. 853-858.*

138. Min B., Yamane H., Hu-Li J., Paul W.E. Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms. *J. Immunol., 2005, Vol. 174, no. 10, pp. 6039-6044.*

139. Mohan M., Kaushal D., Aye P.P., Alvarez X., Veazey R.S., Lackner A.A. Focused examination of the intestinal epithelium reveals transcriptional signatures consistent with disturbances in enterocyte maturation and differentiation during the course of SIV infection. *PloS One, 2013, Vol. 8, e60122.*

140. Mohri H., Perelson A.S., Tung K., Ribeiro R.M., Ramratnam B., Markowitz M., Kost R., Hurley A., Weinberger L., Cesar D., Hellerstein M.K., Ho D.D. Increased turnover of T lymphocytes in HIV-1 infection and its reduction by antiretroviral therapy. *J. Exp. Med., 2001, Vol. 194, no. 9, pp. 1277-1287.*

141. Moller H.J. Soluble CD163. *Scand. J. Clin. Lab. Invest., 2012, Vol. 72, no. 1, pp. 1-13.*

142. Moniuszko M., Kowal K., Rusak M., Pietruczuk M., Dabrowska M., Bodzenta-Lukaszyk A. Monocyte CD163 and CD36 expression in human whole blood and isolated mononuclear cell samples: influence of different anticoagulants. *Clin. Vaccine Immunol., 2006, Vol. 13, no. 6, pp. 704-707.*

143. Murali-Krishna K., Lau L.L., Sambhara S., Lemonnier F., Altman J., Ahmed R. Persistence of memory CD8 T cells in MHC class I-deficient mice. *Science, 1999, Vol. 286, no. 5443, pp. 1377-1381.*

144. Nazli A., Chan O., Dobson-Belaire W.N., Ouellet M., Tremblay M.J., Gray-Owen S.D., Arsenault A.L., Kaushic C. Exposure to HIV-1 directly impairs mucosal epithelial barrier integrity allowing microbial translocation. *PloS Pathogens, 2010, Vol. 6, e1000852.* doi: 10.1371/journal.ppat.1000852.

145. Neuhaus J., Jacobs D.R., Baker J.V., Calmy A., Duprez D., La Rosa A., Kuller L.H., Pett S.L., Ristola M., Ross M.J., Shlipak M.G., Tracy R., Neaton J.D., Grp I.R., Grp S.R., Grp M.R., Adults C.A.D.Y. Markers of inflammation, coagulation, and renal function are elevated in adults with HIV infection. *J. Infect. Dis., 2010, Vol. 201, no. 12, pp. 1788-1795.*

146. Neujahr D.C., Chen C.Q., Huang X., Markmann J.F., Cobbold S., Waldmann H., Sayegh M.H., Hancock W.W., Turka L.A. Accelerated memory cell homeostasis during T cell depletion and approaches to overcome it. *J. Immunol., 2006, Vol. 176, no. 8, pp. 4632-4639.*

147. Norris S., Coleman A., Kuri-Cervantes L., Bower M., Nelson M., Goodier M.R. PD-1 expression on natural killer cells and CD8 (+) T cells during chronic HIV-1 infection. *Viral Immunol., 2012, Vol. 25, no. 4, pp. 329-332.*

148. Novati S., Sacchi P., Cima S., Zuccaro V., Columpsi P., Pagani L., Filice G., Bruno R. General issues on microbial translocation in HIV-infected patients. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci., 2015, Vol. 19, no. 5, pp. 866-878.*

149. Okoye A.A., Picker L.J. CD4 (+) T-cell depletion in HIV infection: mechanisms of immunological failure. *Immunol. Rev., 2013, Vol. 254, no. 1, pp. 54-64.*

150. Ostler T., Pircher H., Ehl S. «Bystander» recruitment of systemic memory T cells delays the immune response to respiratory virus infection. *Eur. J. Immunol., 2003, Vol. 33, no. 7, pp. 1839-1848.*

151. Paiardini M., Muller-Trutwin M. HIV-associated chronic immune activation. *Immunol. Rev., 2013, Vol. 254, pp. 78-101.*

152. Paolini R., Bernardini G., Molfetta R., Santoni A. NK cells and interferons. *Cytokine Growth Factor Rev., 2015, Vol. 26, no. 2, pp. 113-120.*

153. Pelsers M.M.A.L., Namiot Z., Kisielewski W., Namiot A., Januszkiewicz M., Hermens W.T., Glatz J.F.C. Intestinal-type and liver-type fatty acid-binding protein in the intestine. Tissue distribution and clinical utility. *Clin. Biochem., 2003, Vol. 36, no. 7, pp. 529-535.*

154. Penna G., Sozzani S., Adorini L. Cutting edge: selective usage of chemokine receptors by plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol., 2001, Vol. 167, no. 4, pp. 1862-1866.*

155. Perkins M.R., Bartha I., Timmer J.K., Liebner J.C., Wolinsky D., Gunthard H.F., Hauser C., Bernasconi E., Hoffmann M., Calmy A., Battegay M., Telenti A., Douek D.C., Fellay J., Study S.H.C. The interplay between host genetic variation, viral replication, and microbial translocation in untreated HIV-infected individuals. *J. Infect. Dis., 2015, Vol. 212, no. 4, pp. 578-584.*

156. Pijls K.E., Jonkers D.M.A.E., Elamin E.E., Masclee A.A.M., Koek G.H. Intestinal epithelial barrier function in liver cirrhosis: an extensive review of the literature. *Liver Int., 2013, Vol. 33, no. 10, pp. 1457-1469.*

157. Pinckard J.K., Sheehan K.C.F., Arthur C.D., Schreiber R.D. Constitutive shedding of both p55 and p75 murine TNF receptors *in vivo. J. Immunol., 1997, Vol. 158, no. 8, pp. 3869-3873.*

158. Pontrelli G., Martino A.M., Tchidjou H.K., Citton R., Mora N., Rava L., Tozzi A.E., Palma P., Muraca M., Franco E., Rossi P., Bernardi S. HIV is associated with thrombophilia and high D-dimer in children and adolescents. *Aids, 2010, Vol. 24, no. 8, pp. 1145-1151.*

159. Ramirez L.A., Arango T.A., Thompson E., Naji M., Tebas P., Boyer J.D. High IP-10 levels decrease T cell function in HIV-1-infected individuals on ART. *J. Leuk. Biol., 2014, Vol. 96, no. 6, pp. 1055-1063.*

160. Relucio K.I., Beernink H.T., Chen D., Israelski D.M., Kim R., Holodniy M. Proteomic analysis of serum cytokine levels in response to highly active antiretroviral therapy (HAART). *J. Proteome Res., 2005, Vol. 4, no. 2, pp. 27-231.*

161. Ridker P.M. High-sensitivity C-reactive protein, inflammation, and cardiovascular risk: From concept to clinical practice to clinical benefit. *Am. Heart J., 2004, Vol. 148, no. 1, pp. S19-S26.*

162. Rodger A.J., Fox Z., Lundgren J.D., Kuller L.H., Boesecke C., Gey D., Skoutelis A., Goetz M.B., Phillips A.N., Management I.S. Activation and coagulation biomarkers are independent predictors of the development of opportunistic disease in patients with HIV infection. *J. Infect. Dis., 2009, Vol. 200, no. 6, pp. 973-983.*

163. Roe B., Coughlan S., Hassan J., Grogan A., Farrell G., Norris S., Bergin C., Hall W.W. Elevated serum levels of interferon-gamma-inducible protein-10 in patients coinfected with hepatitis C virus and HIV. *J. Infect. Dis., 2007, Vol. 196, no. 7, pp. 1053-1057.*

164. Romagnani P., Annunziato F., Lazzeri E., Cosmi L., Beltrame C., Lasagni L., Galli G., Francalanci M., Manetti R., Marra F., Vanini V., Maggi E., Romagnani S. Interferon-inducible protein 10, monokine induced by interferon gamma, and interferon-inducible T-cell alpha chemoattractant are produced by thymic epithelial cells and attract T-cell receptor (TCR) alphabeta$^+$ CD8$^+$ single-positive T cells, TCRgammadelta$^+$ T cells, and natural killer-type cells in human thymus. *Blood, 2001, Vol. 97, no. 3, pp. 601-607.*

165. Romagnani P., Lazzeri E., Lasagni L., Mavilia C., Beltrame C., Francalanci M., Rotondi M., Annunziato F., Maurenzig L., Cosmi L., Galli G., Salvadori M., Maggi E., Serio M. IP-10 and Mig production by glomerular cells in human proliferative glomerulonephritis and regulation by nitric oxide. *J. Am. Soc. Nephrol., 2002, Vol. 13, no. 1, pp. 53-64.*

166. Romagnani P., Crescioli C. CXCL10: a candidate biomarker in transplantation. *Clin. Chim. Acta, 2012, Vol. 413, no. 17-18, pp. 1364-1373.*

167. Sachsenberg N., Perelson A.S., Yerly S., Schockmel G.A., Leduc D., Hirschel B., Perrin L. Turnover of CD4 (+) and CD8 (+) T lymphocytes in HIV-1 infection as measured by Ki-67 antigen. *J. Exp. Med., 1998, Vol. 187, no. 8, pp. 1295-1303.*

168. Sandler N.G., Wand H., Roque A., Law M., Nason M.C., Nixon D.E., Pedersen C., Ruxrungtham K., Lewin S.R., Emery S., Neaton J.D., Brenchley J.M., Deeks S.G., Sereti I., Douek D.C., Grp I.S.S. Plasma Levels of Soluble CD14 Independently Predict Mortality in HIV Infection. *J. Infect. Dis., 2011, Vol. 203, no. 6, pp. 780-790.*

169. Schaer D.J., Boretti F.S., Schoedon G., Schaffner A. Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *Br. J. Haematol., 2002, Vol. 119, no. 1, pp. 239-243.*

170. Sedger L.M., McDermott M.F. TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants – past, present and future. *Cytokine Growth Factor Rev., 2014, Vol. 25, no. 4, pp. 453-472.*

171. Sharpstone D., Neild P., Crane R., Taylor C., Hodgson C., Sherwood R., Gazzard B., Bjarnason I. Small intestinal transit, absorption, and permeability in patients with AIDS with and without diarrhoea. *Gut, 1999, Vol. 45, no. 1, pp. 70-76.*

172. Shive C.L., Biancotto A., Funderburg N.T., Pilch-Cooper H.A., Valdez H., Margolis L., Sieg S.F., McComsey G.A., Rodriguez B., Lederman M.M. HIV-1 is not a major driver of increased plasma IL-6 levels in chronic HIV-1 disease. *JAIDS, 2012, Vol. 61, no. 2, pp. 145-152.*

173. Shive C.L., Jiang W., Anthony D.D., Lederman M.M. Soluble CD14 is a nonspecific marker of monocyte activation. *AIDS, 2015, Vol. 29, no. 10, pp. 1263-1265.*

174. Silvestri G., Sodora D.L., Koup R.A., Paiardini M., O'Neil S.P., McClure H.M., Staprans S.I., Feinberg M.B. Nonpathogenic SIV infection of sooty mangabeys is characterized by limited bystander immunopathology despite chronic high-level viremia. *Immunity, 2003, Vol. 18, no. 3, pp. 441-452.*

175. Simmons R.P., Scully E.P., Groden E.E., Arnold K.B., Chang J.J., Lane K., Lifson J., Rosenberg E., Lauffenburger D.A., Altfeld M. HIV-1 infection induces strong production of IP-10 through TLR7/9-dependent pathways. *AIDS, 2013, Vol. 27, no. 16, pp. 2505-2517.*

176. Smith A.J., Schacker T.W., Reilly C.S., Haase A.T. A role for syndecan-1 and claudin-2 in microbial translocation during HIV-1 infection. *JAIDS, 2010, Vol. 55, no. 3, pp. 306-315.*

177. Stacey A.R., Norris P.J., Qin L., Haygreen E.A., Taylor E., Heitman J., Lebedeva M., DeCamp A., Li D.F., Grove D., Self S.G., Borrow P. Induction of a striking systemic cytokine cascade prior to peak viremia in acute human immunodeficiency virus type 1 infection, in contrast to more modest and delayed responses in acute hepatitis B and C vrus infections. *J. Virol., 2009, Vol. 83, no. 8, pp. 3719-3733.*

178. Stevenson M., Stanwick T.L., Dempsey M.P., Lamonica C.A. HIV-1 replication is controlled at the level of T-cell activation and proviral integration. *Embo J., 1990, Vol. 9, no. 5, pp. 1551-1560.*

179. Stylianou E., Aukrust P., Bendtzen K., Muller F., Froland S.S. Interferons and interferon (IFN)-inducible protein 10 during highly active anti-retroviral therapy (HAART) – possible immunosuppressive role of IFN-alpha in HIV infection. *Clin. Exp. Immunol., 2000, Vol. 119, no. 3, pp. 479-485.*

180. Subramanian S., Tawakol A., Burdo T.H., Abbara S., Wei J., Vijayakumar J., Corsini E., Abdelbaky A., Zanni M.V., Hoffmann U., Williams K.C., Lo J., Grinspoon S.K. Arterial inflammation in patients with HIV. *JAMA, 2012, Vol. 308, no. 4, pp. 379-386.*

181. Sulahian T.H., Hogger P., Wahner A.E., Wardwell K., Goulding N.J., Sorg C., Droste A., Stehling M., Wallace P.K., Morganelli P.M., Guyre P.M. Human monocytes express CD163, which is upregulated by IL-10 and identical to p155. *Cytokine, 2000, Vol. 12, no. 9, pp. 1312-1321.*

182. Surh C.D., Sprent J. Homeostasis of naive and memory T cells. *Immunity, 2008, Vol. 29, no. 6, pp. 848-862.*

183. Swain S.L., Hu H., Huston G. Class II-independent generation of CD4 memory T cells from effectors. *Science, 1999, Vol. 286, no. 5443, pp. 1381-1383.*

184. Takeda S., Rodewald H.R., Arakawa H., Bluethmann H., Shimizu T. MHC class II molecules are not required for survival of newly generated $CD4^+$ T cells, but affect their long-term life span. *Immunity, 1996, Vol. 5, no. 3, pp. 217-228.*

185. Tan J.T., Dudl E., LeRoy E., Murray R., Sprent J., Weinberg K.I., Surh C.D. IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2001, Vol. 98, no. 15, pp. 8732-8737.*

186. Tanchot C., Lemonnier F.A., Perarnau B., Freitas A.A., Rocha B. Differential requirements for survival and proliferation of CD8 naive or memory T cells. *Science, 1997, Vol. 276, no. 5321, pp. 2057-2062.*

187. Targan S.R., Landers C.J., Yang H.Y., Lodes M.J., Cong Y.Z., Papadakis K.A., Vasiliauskas E., Elson C.O., Hershberg R.M. Antibodies to CBir1 flagellin define a unique response that is associated independently with complicated Crohn's disease. *Gastroenterology, 2005, Vol. 128, no. 7, pp. 2020-2028.*

188. Tchao N.K., Turka L.A. Lymphodepletion and homeostatic proliferation: Implications for transplantation. *Am. J. Transplant., 2012, Vol. 12, no. 5, pp. 1079-1090.*

189. Thieblemont N., Weiss L., Sadeghi H.M., Estcourt C., HaeffnerCavaillon N. CD14 (low) CD16 (high): A cytokine-producing monocyte subset which expands during human immunodeficiency virus infection. *Eur. J. Immunol., 1995, Vol. 25, no. 12, pp. 3418-3424.*

190. Tiemessen M.M., Jagger A.L., Evans H.G., van Herwijnen M.J., John S., Taams L.S. $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2007, Vol. 104, no. 49, pp. 19446-19451.*

191. Tilling R., Kinloch S., Goh L.E., Cooper D., Perrin L., Lampe F., Zaunders J., Hoen B., Tsoukas C., Andersson J., Janossy G., Grp Q.S. Parallel decline of $CD8^+/CD38^{++}$ T cells and viraemia in response to quadruple highly active antiretroviral therapy in primary HIV infection. *AIDS, 2002, Vol. 16, no. 4, pp. 589-596.*

192. Tough D.F., Borrow P., Sprent J. Induction of bystander T cell proliferation by viruses and type I interferon *in vivo*. *Science, 1996, Vol. 272, no. 5270, pp. 1947-1950.*

193. Tough D.F., Sprent J. Anti-viral immunity: Spotting virus-specific T cells. *Curr. Biol., 1998, Vol. 8, no. 14, pp. R498-R501.*

194. Triant V.A., Lee H., Hadigan C., Grinspoon S.K. Increased acute myocardial infarction rates and cardiovascular risk factors among patients with human immunodeficiency virus disease. *J. Clin. Endocr. Metab., 2007, Vol. 92, no. 7, pp. 2506-2512.*

195. Trzonkowski P., Mysliwska J., Pawelec G., Mysliwski A. From bench to bedside and back: the SENIEUR Protocol and the efficacy of influenza vaccination in the elderly. *Biogerontology, 2009, Vol. 10, no. 1, pp. 83-94.*

196. Unutmaz D., Pileri P., Abrignani S. Antigen-independent activation of naive and memory resting T-cells by a cytokine combination. *J. Exp. Med., 1994, Vol. 180, no. 3, pp. 1159-1164.*

197. Uysal H.K., Sohrabi P., Habip Z., Saribas S., Kocazeybek E., Seyhan F., Caliskan R., Bonabi E., Yuksel P., Birinci I., Uysal O., Kocazeybek B. Neopterin and soluble CD14 levels as indicators of immune activation in cases with indeterminate pattern and true positive HIV-1 infection. *PLoS One, 2016, Vol. 11, no. 3, e0152258.*

198. Vallelian F., Schaer C.A., Kaempfer T., Gehrig P., Duerst E., Schoedon G., Schaer D.J. Glucocorticoid treatment skews human monocyte differentiation into a hemoglobin-clearance phenotype with enhanced heme-iron recycling and antioxidant capacity. *Blood, 2010, Vol. 116, no. 24, pp. 5347-5356.*

199. van Snick J. Interleukin-6 – an Overview. *Annu. Rev. Immunol., 1990, Vol. 8, no. pp. 253-278.*

200. Wang L., Llorente C., Hartmann P., Yang A.M., Chen P., Schnabl B. Methods to determine intestinal permeability and bacterial translocation during liver disease. *J. Immunol. Methods, 2015, Vol. 421, no. pp. 44-53.*

201. Weaver L.K., Pioli P.A., Wardwell K., Vogel S.N., Guyre P.M. Up-regulation of human monocyte CD163 upon activation of cell-surface Toll-like receptors. *J. Leuk. Biol., 2007, Vol. 81, no. 3, pp. 663-671.*

202. Werner E.R., Werner-Felmayer G., Fuchs D., Hausen A., Reibnegger G., Wels G., Yim J.J., Pfleiderer W., Wachter H. 6-Pyruvoyl tetrahydropterin synthase assay in extracts of cultured human cells using high-performance liquid chromatography with fluorescence detection of biopterin. *J. Chromatogr., 1991, Vol. 570, no. 1, pp. 43-50.*

203. Wiercinska-Drapalo A., Flisiak R., Jaroszewicz J., Prokopowicz D. Increased plasma transforming growth factor-beta(1) is associated with disease progression in HIV-1-infected patients. *Viral Immunol., 2004, Vol. 17, no. 1, pp. 109-113.*

204. Williams L., Jarai G., Smith A., Finan P. IL-10 expression profiling in human monocytes. *J. Leuk. Biol., 2002, Vol. 72, no. 4, pp. 800-809.*

205. Wilson E.M.P., Singh A., Hullsiek K.H., Gibson D., Henry W.K., Lichtenstein K., Onen N.F., Kojic E., Patel P., Brooks J.T., Sereti I., Baker J.V., Era U.N.H.H.A. Monocyte-activation phenotypes are associated with biomarkers of inflammation and coagulation in chronic HIV infection. *J. Infect. Dis., 2014, Vol. 210, no. 9, pp. 1396-1406.*

206. Wirleitner B., Schroecksnadel K., Winkler C., Fuchs D. Neopterin in HIV-1 infection. *Mol. Immunol., 2005, Vol. 42, no. 2, pp. 183-194.*

207. Yan N., Regalado-Magdos A.D., Stiggelbout B., Lee-Kirsch M.A., Lieberman J. The cytosolic exonuclease TREX1 inhibits the innate immune response to human immunodeficiency virus type 1. *Nat. Immunol., 2010, Vol. 11, no. 11, pp. 1005-1013.*

208. Yoshida H., Hashizume M., Suzuki M., Mihara M. Anti-IL-6 receptor antibody suppressed T cell activation by inhibiting IL-2 production and inducing regulatory T cells. *Eur. J. Pharmacol., 2010, Vol. 634, no. 1-3, pp. 178-183.*

209. Zack J.A., Arrigo S.J., Weitsman S.R., Go A.S., Haislip A., Chen I.S.Y. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes – molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell, 1990, Vol. 61, no. 2, pp. 213-222.*

210. Zangerle R., Gallati H., Sarcletti M., Wachter H., Fuchs D. Tumor necrosis factor alpha and soluble tumor necrosis factor receptors in individuals with human immunodeficiency virus infection. *Immunol. Lett., 1994, Vol. 41, no. 2-3, pp. 229-234.*

211. Zangerle R., Gallati H., Sarcletti M., Weiss G., Denz H., Wachter H., Fuchs D. Increased serum concentrations of soluble tumor necrosis factor receptors in HIV-infected individuals are associated with immune activation. *JAIDS, 1994, Vol. 7, no. 1, pp. 79-85.*

212. Zangerle R., Steinhuber S., Sarcletti M., Dierich M.P., Wachter H., Fuchs D., Most J. Serum HIV-1 RNA levels compared to soluble markers of immune activation to predict disease progression in HIV-1-infected individuals. *Int. Arch. Allergy Imm., 1998, Vol. 116, no. 3, pp. 228-239.*

213. Zapater P., Frances R., Gonzalez-Navajas J.M., de la Hoz M.A., Moreu R., Pascual S., Monfort D., Montoliju S., Vila C., Escudero A., Torras X., Girera I., Llanos L., Guarner-Argente C., Palazon J.M., Carnicer F., Bellot P., Guarner C., Planas R., Sola R., Serra M.A., Munoz C., Perez-Mateo M., Such J. Serum and ascitic fluid bacterial DNA: a new independent prognostic factor in noninfected patients with cirrhosis. *Hepatology, 2008, Vol. 48, no. 6, pp. 1924-1931.*

214. Zhang X., Sun S., Hwang I., Tough D.F., Sprent J. Potent and selective stimulation of memory-phenotype $CD8^+$ T cells *in vivo* by IL-15. *Immunity, 1998, Vol. 8, no. 5, pp. 591-599.*

215. Zwadlo G., Voegeli R., Schulze Osthoff K., Sorg C. A monoclonal antibody to a novel differentiation antigen on human macrophages associated with the down-regulatory phase of the inflammatory process. *Exp. Cell. Biol., 1987, Vol. 55, no. 6, pp. 295-304.*

Авторы:

Шмагель К.В. *— д.м.н., заведующий лабораторией экологической иммунологии ГБУН «Институт экологии и генетики микроорганизмов» УрО РАН; ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*

Шмагель Н.Г. *— к.м.н., врач-иммунолог ГКУЗ «Пермский краевой центр по борьбе со СПИД и инфекционными заболеваниями»; ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*

Черешнев В.А. *— д.м.н., академик РАН, директор ФГБУН «Институт иммунологии и физиологии» УрО РАН, г. Екатеринбург; ФГБОУ ВПО «Пермский государственный национальный исследовательский университет», г. Пермь, Россия*

Authors:

Shmagel K.V.*, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Ecological Immunology, Institute of Ecology and Genetics of Microorganisms, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Perm State University, Perm, Russian Federation*

Shmagel N.G.*, PhD (Medicine), Clinical Immunologist, Perm Regional Center for Protection against AIDS and Infectious Diseases; Perm State University, Perm, Russian Federation*

Chereshnev V.A.*, PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Sciences, Director, Institute of Immunology and Physiology, Ural Branch, Russian Academy of Sciences; Perm State University, Perm, Russian Federation*

Поступила 17.11.2016
Принята к печати 26.01.2017

Received 17.11.2016
Accepted 26.01.2017

Медицинская иммунология
2017, Т. 19, № 5, стр. 505-512
© 2017, СПб РО РААКИ

Обзоры
Reviews

Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya
2017, Vol. 19, № 5, pp. 505-512
© 2017, SPb RAACI

КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ ПЕРВИЧНЫХ ИММУНОДЕФИЦИТНЫХ СОСТОЯНИЙ И ИХ РАННЕГО ОБНАРУЖЕНИЯ

Корсунский И.А.[1], Гордукова М.А.[1], Козлов И.Г.[3, 4], Продеус А.П.[1, 3, 4], Корсунский А.А.[1, 2]

[1] ГБУЗ «Детская городская больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия
[2] ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия
[3] ФГБУ «Федеральный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», Москва, Россия
[4] ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова», Москва, Россия

Резюме. Неонатальный скрининг первичных иммунодефицитных состояний делает возможным раннее обнаружение тяжелых и среднетяжелых поражений иммунной системы, а эффективность современных протоколов лечения этой группы заболеваний несомненна. Результаты нескольких запущенных в последние годы скрининговых программ показывают высокую чувствительность и специфичность скрининга, высокую выживаемость пациентов, что, в свою очередь, доказывает необходимость введения первичных иммунодефицитных состояний в программу неонатального скрининга России.

Ключевые слова: ПИД, ТКИН, неонатальный скрининг, TREC, KREC

CLINICAL AND EPIDEMIOLOGICAL ASPECTS OF PRIMARY IMMUNODEFICIENCY DISEASES (PID) AND EARLY DIAGNOSIS OPTIONS

Korsunskiy I.A.[a], Gordukova M.A.[a], Kozlov I.G.[c, d], Prodeus A.P.[a, c, d], Korsunskiy A.A.[a, b]

[a] Moscow City Pediatric G. Speransky Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation
[b] The First Moscow I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation
[c] Federal D. Rogachev Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation
[d] Russian National Research N.I. Pirogov Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Neonatal screening for primary immunodeficiencies (PID) provides a unique opportunity for early detection of moderate to severe immune disorders. Thus, the patients could be provided with best available

Адрес для переписки:
Корсунский Илья Анатольевич
ГБУЗ «Детская городская больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ»
123317, Россия, Москва, Шмитовский проезд, 29.
Тел.: 8 (903) 571-77-85.
E-mail: iliakors@gmail.com

Address for correspondence:
Korsunskiy Ilya A.
Moscow City Pediatric G. Speransky Clinical Hospital No. 9
123317, Russian Federation, Moscow, Shmitovskiy proezd, 29.
Phone: 7 (903) 571-77-85.
E-mail: iliakors@gmail.com

Образец цитирования:
И.А. Корсунский, М.А. Гордукова, Д.Б. Мунблит, И.Г. Козлов, А.П. Продеус, А.А. Корсунский «Клинические и эпидемиологические аспекты первичных иммунодефицитных состояний и их раннего обнаружения» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 505-512. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-505-512

© Корсунский И.А. и соавт., 2017

For citation:
I.A. Korsunskiy, M.A. Gordukova, D.B. Munblit, I.G. Kozlov, A.P. Prodeus, A.A. Korsunskiy "Clinical and epidemiological aspects of Primary Immunodeficiency Diseases (PID) and early diagnosis options", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 505-512. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-505-512

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-505-512

therapy, due to effective treatment according to updated PID management guidelines. Clinical outcomes of recently implemented screening programs have demonstrated high sensitivity and specificity of the diagnostic techniques used and good survival rates. The existing evidence provides a strong basis for inclusion of PID screening into general Russian neonatal screening program.

Keywords: primary immune deficiency, SCID, NBS, TREC, KREC

Введение

Первичные иммунодефицитные состояния (ПИДС) представляют собой гетерогенную группу врожденных дефектов клеток иммунной системы, которые клинически чаще всего проявляются в виде рецидивирующих инфекционных и аутоиммунных заболеваний разной степени тяжести, а также злокачественных новообразований. Тяжелые формы ПИДС приводят к летальным исходам в первые два года жизни [23, 54]. Менее тяжелые формы приводят к необратимым изменениям в организме, которые значительно снижают качество жизни человека. Чаще всего ПИДС могут быть охарактеризованы сниженными функциональными способностями лейкоцитов бороться с инфекциями, однако, некоторые расстройства связаны с ограниченной дифференцировкой лимфоидных клеток или их увеличенным апоптозом [5].

Большая часть ПИДС является моногенными заболеваниями, некоторые из них имеют более сложное полигенное происхождение.

За исключением селективного дефицита иммуноглобулина А, который встречается с частотой 1:500 [3], все другие формы ПИДС обнаруживаются реже и имеют общую распространенность приблизительно 1:10000. По данным исследований, среди населения с высоким уровнем близкородственных браков или среди генетически изолированных популяций частота ПИДС значительно выше [38].

Большинство новорожденных с серьезными дефектами иммунной системы – тяжелыми комбинированными иммунными недостаточностями (ТКИН) – могут казаться здоровыми при рождении и остаются таковыми в течение первых месяцев жизни. Так продолжается до тех пор, пока врожденная неспособность вырабатывать Т- и В-лимфоциты остается компенсированной антитело-опосредованным материнским иммунитетом. Что касается менее тяжелых форм ПИДС, их клинические проявления очень индивидуальны, но практически всегда неспецифичны, что приводит к сильной задержке в постановке правильного диагноза и назначении адекватного лечения.

Выявление заболевания и назначение необходимой терапии для пациентов с ПИДС практически всегда являются запоздалыми. Как можно более ранняя диагностика этих состояний должна быть приоритетом для системы здравоохранения.

Генетическое разнообразие ПИДС

Нарушение экспрессии различных белков может приводить к предотвращению развития или негативному влиянию на созревание Т- и В-лимфоцитов, сочетаться с неспособностью продуцировать специфические антитела, что вызывает ухудшение клеточного и/или гуморального иммунитета, приводит к развитию первичных иммунодефицитных состояний вплоть до ТКИН [5, 38, 50]. На данный момент известно по меньшей мере 200 генетически врожденных нарушений иммунитета. Экспертный комитет международного союза иммунологических обществ (IUIS) предложил универсальную классификацию ПИДС [5, 39, 41].

ПИДС сгруппированы в восемь категорий по основному механизму каждого заболевания: комбинированные Т- и В-клеточные иммунодефициты, четко определенные синдромы с иммунодефицитами, дефицит антителообразования, заболевания с иммунной дисрегуляцией, врожденные пороки фагоцитов, дефекты врожденного иммунитета, аутовоспалительные заболевания и дефекты комплемента. Некоторые нозологии можно встретить в более чем одной категории. Благодаря появлению секвенирования следующего поколения число известных дефектов растет с каждым годом [16, 20, 37] все более быстрыми темпами, что заставляет обновлять классификацию каждый год. Самыми тяжелыми ПИДС являются заболевания из первой группы классификации – тяжелые комбинированные иммунные недостаточности.

Суммируя отчеты центров трансплантации гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), можно утверждать, что у половины всех пациентов с ТКИН выявляется Х-сцепленная мутация IL2RG, в то время как все остальные известные ТКИН вызваны аутосомно-рецессивными мутациями [14, 48]. При всех формах ТКИН количество Т-лимфоцитов резко снижено, иногда до нуля, а количество В- и NK-клеток варьирует в зависимости от дефекта гена [4]. Некоторые мутации приводят к таким ПИДС, при которых происходит развитие небольшого количества Т- и В-клеток, что обуславливает смазанное течение заболевания. Учитывая вышесказанное, особое внимание следует уделять таким неиммунологическим проявлениям ПИДС как скелетные, неврологические и дерматологические аномалии, а также к аутоиммунным заболеваниям [4].

Несмотря на многообразие мутаций, у самых тяжелых, требующих пристального внимания де-

тей, есть общая черта – нарушение Т-клеточного звена иммунитета, которое и влечет за собой классические проявления ИДС: вторичные к вакцинации БЦЖиты и рецидивирующие поносы, пневмоцистные пневмонии, тяжелое течение цитомегаловирусных (ЦМВ)-инфекции, грибковых инфекций и так далее [8].

Эпидемиология ТКИН

Иммунодефицитные состояния классифицируются в соответствии с тем компонентом иммунной системы, которая вовлечена в патологический процесс [24]. Так, на сегодняшний день известно около двух сотен дефектов, которые приводят к врожденным иммунодефицитам и каждый год выявляется около 30 новых мутаций [16]. Самое большое внимание специалистов приковано к ТКИН, поскольку дети именно с этим состоянием заболевают и умирают в первый год жизни.

До появления ТКИН в системе неонатального скрининга Соединенных Штатов Америки (США) считалось, что риск приводящей к нему мутации в европеоидной популяции равен примерно 1 случай на 100000 живых новорожденных [14, 48], исключение составляли некоторые закрытые этнические группы типа индейцев Навахо, сомалийских племен или общин меннонитов, у которых встречаемость тяжелых ПИДС приближается к 1 на 2000-5000 живых новорожденных [28, 29, 36, 46]. Однако, нельзя забывать, что дети с ПИДС часто развивают аутоиммунные заболевания, оппортунистические инфекции и прочие тяжелые состояния, погибая до того, как им поставят правильный диагноз. Из этого следует, что выявленные случаи ПИДС не отражали реальной эпидемиологической картины [30].

В 2008 году в штате Висконсин (США) был запущен пилотный проект неонатального скрининга тяжелых комбинированных иммунных недостаточностей методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) реального времени. Аналитом послужили эксцизионные кольца ДНК, получившие название TREC (TCR rearrangement excision circles). В 2010 году, когда были получены первые результаты, тест был рекомендован к рассмотрению кандидатом на включение в систему неонатального скрининга в США.

К 2014 году 11 программами неонатального скрининга (штаты Калифорния, Колорадо, Коннектикут, Делавэр, Массачусетс, Мичиган, Миссисипи, Нью Йорк, Техас и Висконсин, а также племя индейцев Навахо) суммарно было обследовано чуть более 3 миллионов новорожденных [31]. Было выявлено 42 ребенка с типичными ТКИН, 9 нетипичных пациентов со стертой симптоматикой ТКИН и один синдром Omenn [31]. 49 детей получили специфическую терапию, включающую ТГСК, генную и фермент-заместительную терапию. Остальные три ребенка умерли от различных, в том числе инфекционных, осложнений. Из 44 детей, прошедших ТГСК, 4 ребенка умерли от осложнений химиотерапии, что соответствует уровню выживаемости детей первых 3,5 месяцев жизни после проведения ТГСК [15].

К настоящему моменту, 37 штатов США делают это исследование на постоянной основе, а еще 12 активно работают над этим. Таким образом, у более чем 70% новорожденных в США исследуют уровень TREC для выявления ТКИН.

ТКИН являются наиболее тяжелой, жизнеугрожающей группой заболеваний, однако не только они могут претендовать на введение в программу неонатального скрининга [11, 12, 26] и скрининга пациентов из групп риска по развитию иммунодефицитных состояний.

Неонатальный скрининг

Цель неонатального скрининга – выявление врожденных заболеваний до их клинической манифестации. Первым заболеванием, которое начали выявлять сразу после рождения ребенка, стала фенилкетонурия. Простота лабораторной диагностики и эффективность терапии задали тон всему процессу, который стартовал более 50 лет назад в США и с тех пор только расширяется [17]. Использование сухих пятен крови на картах Гатри облегчает транспортировку и хранение образцов, стандартизует и упрощает лабораторную диагностику. Отлаженная система сбора крови новорожденных и достижения современной медицины значительно облегчают раннюю диагностику врожденных заболеваний, что позволяет применять более эффективные протоколы лечения, сокращает инвалидизацию и смертность среди детей [21, 25].

Основные критерии включения нозологии в систему неонатального скрининга таковы: невозможность определения заболевания рутинными методами неонатолога и педиатра при рождении ребенка, значительное негативное влияние заболевания на здоровье новорожденного, возможность излечения либо значительного улучшения качества жизни пациента при ранней постановке диагноза, наличие анализа – золотого стандарта постановки диагноза, а также существование простого, недорогого, специфичного лабораторного анализа для скрининга искомого заболевания [53].

В настоящий момент в России на федеральном уровне проводится скрининг на 5 врожденных заболеваний: фенилкетонурия, врожденный гипотиреоз, адреногенитальный синдром, муковисцидоз и галактоземия [2]. На региональном уровне департаменты здравоохранения имеют возможность дополнять этот список. В частности, министерство здравоохранения Свердловской области расширило список до 16 нозологий, добавив лейциноз, тирозинемию, цитруллинемию, множественную карбоксилазную недоста-

точность, недостаточность очень длинных цепей ацил-CoA-дегидрогиназы жирных кислот, недостаточность средних цепей ацил-CoA-дегидрогиназы жирных кислот, недостаточность митохондриального трифункционального белка, глютаровую ацидурию, изовалериановую ацидемию, метилмалоновую ацидемию и пропионовую ацидемию [1].

Возвращаясь к первичным иммунодефицитным состояниям, стоит вспомнить первые попытки включения ТКИН, а именно недостаточности аденозин деаминазы, в систему неонатального скрининга, которые были предприняты еще в 70-е годы прошлого века. Однако из-за большого количества как ложноотрицательных, так и ложноположительных результатов [30, 34, 35] методика не нашла должного применения. Затем было предложено исследовать уровень интерлейкина 7, который значительно повышается при некоторых ТКИН, а также уровни $CD3^+$ и $CD45^+$ клеток, но, вследствие разных технических сложностей и эта попытка была неудачна [10, 27, 33].

Еще одним вариантом выявления ПИДС могло бы стать полногеномное или полноэкзомное секвенирование, как это делают в случае скринирования муковисцидоза. Сотни известных и неизвестное количество еще не найденных, приводящих к ПИДС мутаций, дороговизна и длительность выполнения теста, ожидаемое большое количество ложноотрицательных результатов делают этот вариант невыполнимым [32].

Исследование общего уровня лимфоцитов периферической крови новорожденных также было предложено в качестве маркера ПИДС, поскольку при многих ТКИН данный показатель значительно понижается. Однако применение подобного подхода имело бы существенный недостаток – низкую специфичность, так как существует целый ряд состояний, при которых уровень В-клеток высок, что делает исследование общего количества лимфоцитов неинформативным. К тому же транспортировка цельной крови значительно удорожает процесс скрининга [44]. Потенциальным решением могло бы стать исследование пуповинной крови, но финансовые затраты на упомянутую выше транспортировку цельной крови, а также высокая стоимость проточной цитометрии делают невозможным включение этих методик в систему неонатального скрининга [19].

TREC и KREC

Первичные иммунодефицитные состояния могут быть обнаружены с помощью измерения уровней TREC и KREC в сухом пятне крови на карте неонатального скрининга методом полимеразной цепной реакции реального времени (Real-time PCR) [18]. TREC являются побочным продуктом рекомбинации гена Т-клеточного рецептора, а KREC – В-клеточного. Следовательно, низкие уровни несущих эти молекулы лимфоцитов в периферической крови указывают на Т- и/или В-клеточную лимфопению [47].

Созревание функциональных Т- и В-клеток человека сопровождается рекомбинацией и перестройками в генах, кодирующих Т- (TCR) и В- (BCR) клеточные рецепторы [6, 9]. Так, для сборки полноценного Т-клеточного рецептора должна произойти перестройка локуса TCRB, в ходе которой соединяются D и J сегменты с последующим присоединением V сегмента, а также слиянием V и J сегментов локуса TCRA. При этом образуется третий гипервариабельный домен (CDR3) бета- и альфа-цепи соответственно. Во время каждого из этих процессов вырезаемые участки образуют эксцизионные кольца ДНК, получившие название TREC. В соответствии с числом сегментов Va, Ja, Vb, Db и Jb могут образовываться разные типы TRECs: несколько сот различных TRECs при Va-Ja рекомбинации, десятки для Vb-Db и по крайней мере 13 для Db-Jb. Во время перестройки TCRA локуса в большинстве незрелых Т-лимфоцитов происходит делеция TCRD локуса, находящегося внутри и фланкированного V и J сегментами. Этот процесс является специфичным и проходит при участии делеционных последовательностей δRec и ΨJα. Генерируемая при этом кольцевая молекула была названа sjTREC (signal joint TCR rearrangement excision circle), она присутствует практически у всех $\alpha\beta^+$Т-лимфоцитов, выходящих из тимуса, и, таким образом, может служить суррогатным маркером их количества [22].

Процесс формирования функционального рецептора в В-клетках начинается с рекомбинационных событий в IGH локусе, несущем набор различных Vh, D и Jh сегментов, в котором также генерируется большое количество эксцизионных колец ДНК [49]. Если перестройка прошла правильно, начинается рекомбинация в IGK локусе, кодирующем последовательности легкой каппа-цепи иммуноглобулинов. Она начинается слиянием Vk и Jk сегментов и в дальнейшем может сопровождаться рекомбинацией с участием интронной рекомбинационной последовательности (J -C intronRSS) и каппа-делеционным элементом (Kde), что делает каппа-локус нефункциональным, ввиду делеции энхансера и константного района [51]. Данная перестройка ведет к образованию рекомбинационного кольца каппа-делеционного элемента, или KREC (kappa-deleting recombination excision circle), которое присутствует в 30% $Ig\kappa^+$ и почти всех $Ig\lambda^+$ зрелых наивных В-лимфоцитах [51]. ДНК KREC также может быть суррогатным маркером зрелых наивных В-лимфоцитов, использоваться для оценки их пролиферативной истории [52].

Уровни TREC и KREC могут быть оценены с помощью количественной ПЦР с детекцией в режиме реального времени и, ввиду прямого

маркирования зрелых наивных Т- и В-лимфоцитов, имеют высокий диагностический потенциал. Количественный анализ TREC активно применяется для оценки функции тимуса и неогенеза Т-клеток. Он был использован для диагностики иммунодефицитов [7], для неонатального скрининга ПИД у новорожденных [43] и как предиктор восстановления Т-клеточной функции после пересадки костного мозга [45].

Квантификация TREC с помощью ПЦР в режиме реального времени и конструирование плазмиды, несущей фрагмент TREC, необходимой для построения калибровочной кривой, была описана Douek с соавт. еще в 1998 году [22]. В дальнейшем были предложены другие варианты ПЦР-РВ (моноплексные и мультиплексные с мишенью, отражающей количество геном-эквивалентов в исследуемой ДНК), при этом для некоторых из них была проведена достаточно тщательная аналитическая и клиническая валидация.

Таким образом, найдены устойчивые в сухих пятнах крови маркеры значительной части первичных иммунодефицитных состояний, количество которых возможно измерить относительно простым, надежным и недорогим лабораторным методом.

Следующими после положительного скрининга шагами должно быть определение наличия у пациента ПИДС или выявление у него иной причины для лимфопении, а затем и генетическое исследование с целью точного определения дефекта.

Терапия ПИДС

Клиническая практика показывает, что как можно более ранняя постановка диагноза и назначение соответствующей терапии улучшает качество жизни пациентов с врожденными заболеваниями, предотвращает развитие многих осложнений, снижает летальность. В группе больных ПИДС наиболее ярко это видно у пациентов с ТКИН.

Наиболее благоприятный исход для этих пациентов достигается трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК) или генной терапией, начатой до манифестации инфекционных заболеваний [13].

Новорожденные с ТКИН, трансплантированные в первые 3,5 месяца жизни, показали уровень выживаемости в 94%. Пациенты старше этого возраста, трансплантированные до появления инфекционных заболеваний, показали уровень выживаемости в 90%. Пациенты с вылеченными инфекционными заболеваниями выживали в 82% случаев. Пациенты с ТГСК во время активного течения инфекционных заболеваний выживают только в половине случаев. Очевидно, что ранняя диагностика ПИДС значимо повышает эффективность лечения [40].

Выводы

Первичные иммунодефицитные состояния и, в особенности, тяжелые комбинированные иммунодефицитные недостаточности полностью соответствуют критериям неонатального скрининга. Учитывая высокую частоту встречаемости заболеваний этой группы, тяжесть течения болезни и осложнений, эффективность трансплантации гемопоэтических стволовых клеток в раннем возрасте, эффективность раннего начала заместительной терапии, простоту и дешевизну лабораторного анализа, ПИДС в общем и ТКИН в частности являются идеальными кандидатами для включения в систему неонатального скрининга России.

Список литературы / References

1. Гордукова М.А., Оскорбин И.П., Мишукова О.В., Зимин С.Б., Зиновьева Н.В., Давыдова Н.В., Смирнова А.С., Никитина И.А., Корсунский И.А., Филипенко М.Л., Продеус А.П. Разработка набора реагентов для количественного определения молекул ДНК TREC и KREC в цельной крови и сухих пятнах крови методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени // Медицинская иммунология, 2015. Т. 17, № 5. С. 467-478. [Gordukova M.A., Oskorbin I.P., Mishukova O.V., Zimin S.B., Zinovieva N.V., Davydova N.V., Smirnova A.S., Nikitina I.A., Korsunskiy I.A., Filipenko M.L., Prodeus A.P. Development of real-time multiplex PCR for the quantitative determination of TREC's and KREC's in whole blood and in dried blood spots. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2015, Vol. 17, no. 5, pp. 467-478.* (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2015-5-467-478.

2. Дерябина С.С., Тузанкина И.А., Власова Е.В., Лаврина С.Г., Шершнев В.Н. Ретроспективная диагностика первичных иммунодефицитных состояний у детей в Свердловской области // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 583-588. [Deryabina S.S., Tuzankina I.A., Vlasova E.V., Lavrina S.G., Shershnev V.N. Retrospective diagnosis of primary immunodeficiencies for children in Sverdlovsk Region. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 583-588.* (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-583-588.

3. Пушкова Е.С., Кан Н.Ю., Федорова Л.А., Корсунский А.А., Продеус А.П., Щербина А.Ю. Вакцинация иммунокомпрометированных детей // Кремлевская медицина. Клинический вестник, 2014. Т. 3. С. 12-17. [Pushkova E.S., Kahn N.Yu., Fedorova L.A., Korsunskiy A.A., Prodeus A.P., Shcherbina A.Yu. Vaccination of immunocompromised children. *Kremliovskaya meditsina. Klinicheskiy vestnik = The Kremlin Medicine. Clinical Gazette, 2014, Vol. 3, pp. 12-17.* (In Russ.)]

4. Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L., Chatila T., Conley M.E., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Franco J.L., Gaspar H.B., Holland S.M., Klein C., Nonoyama S., Ochs H.D., Oksenhendler E., Picard C., Puck J.M., Sullivan K., Tang M.L. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international

union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Frontiers in Immunology, 2014, Vol. 5, p. 162.*

5. Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.L. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Frontiers in Immunology, 2011, Vol. 2, p. 54.*

6. Alt F.W., Oltz E.M., Young F., Gorman J., Taccioli G., Chen J. VDJ recombination. *Immunology Today, 1992, Vol. 11, no. 8, pp. 306-214.*

7. Amariglio N., Lev A., Simon A., Rosenthal E., Spirer Z., Efrati O., Broides A., Rechavi G., Somech R. Molecular assessment of thymus capabilities in the evaluation of T-cell immunodeficiency. *Pediatric Research, 2010, Vol. 67, no. 2, pp. 211-216.*

8. Bakare N., Menschik D., Tiernan R., Hua W., Martin D. Severe combined immunodeficiency (SCID) and rotavirus vaccination: reports to the Vaccine Adverse Events Reporting System (VAERS). *Vaccine, 2010, Vol. 28, no. 40, pp. 6609-6612.*

9. Blackwell T.K., Alt F.W. Mechanism and developmental program of immunoglobulin gene rearrangement in mammals. *Annual Review of Genetics, 1989, Vol. 23, pp. 605-636.*

10. Bolotin E., Annett G., Parkman R., Weinberg K. Serum levels of IL-7 in bone marrow transplant recipients: relationship to clinical characteristics and lymphocyte count. *Bone Marrow Transplantation, 1999, Vol. 23, no. 8, pp. 783-788.*

11. Borte S., von Döbeln U., Fasth A., Wang N., Janzi M., Winiarski J., Sack U., Pan-Hammarström Q., Borte M., Hammarström L. Neonatal screening for severe primary immunodeficiency diseases using high-throughput triplex real-time PCR. *Blood, 2012, Vol. 119, pp. 2552-2555.*

12. Borte S., Wang N., Oskarsdo S. Newborn screening for primary immunodeficiencies: beyond SCID and XLA. *Annals of the New York Academy of Sciences, 2011, Vol. 1246, pp. 118-130.*

13. Brown L., Xu-Bayford J., Allwood Z., Slatter M., Cant A., Davies E.G., Veys P., Gennery A.R., Gaspar H.B. Neonatal diagnosis of severe and combined immunodeficiency leads to significantly improved survival outcome: the case for newborn screening. *Blood, 2011, Vol. 117, pp. 3243-3246.*

14. Buckley R.H., Schiff R.I., Schiff S.E., Markert M.L., Williams L.W., Harville T.O., Roberts J.L., Puck J.M. Human severe combined immunodeficiency: genetic, phenotypic, and functional diversity in one hundred eight infants. *Journal of Pediatrics, 1997, Vol. 130, no. 3, pp. 378-387.*

15. Buckley R.H. Transplantation of hematopoietic stem cells in human severe combined immunodeficiency: longterm outcomes. *Immunologic Research, 2011, Vol. 49, no. 1-3, pp. 25-43.*

16. Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science, 2007, Vol. 317, pp. 617-619.*

17. Centerwall W.R., Chinnock R.F., Pusavat A. Phenylketonuria: screening programs and testing methods. *American Journal of Public Health, 1960, Vol. 50, no. 11, pp. 1667-1677.*

18. Chan K., Puck J.M. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2005, Vol. 115, pp. 391-398.*

19. Collier F., Tang M., Ponsonby A.L., Vuillermin P. Flow cytometric assessment of cord blood as an alternative strategy for population-based screening of severe combined immunodeficiency. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2013, Vol. 131, no. 4, pp. 1251-1252.*

20. Conley M.E., Notarangelo L.D., Casanova J.L. Definition of primary immunodeficiency in 2011: a "trialogue" among friends. *NY Acad. Sci., 2011, Vol. 1238, pp. 1-6.*

21. Cornel M.C., Rigter T., Weinreich S.S., Burgard P., Hoffmann G.F. A framework to start the debate on neonatal screening policies in the EU: an Expert Opinion Document. *European Journal of Human Genetics, 2014, Vol. 22, no. 1, pp. 12-17.*

22. Douek D.C., McFarland R.D., Keiser P.H., Gage E.A., Massey J.M., Haynes B.F., Polis M.A., Haase A.T., Feinberg M.B., Sullivan J.L., Jamieson B.D., Zack J.A., Picker L.J., Koup R.A. Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature, 1998, Vol. 17, no. 39, pp. 690-695.*

23. Dvorak C.C., Cowan M.J., Logan B.R., Notarangelo L.D., Griffith L.M., Puck J.M., Kohn D.B., Shearer W.T., O'Reilly R.J., Fleisher T.A., Pai S.Y., Hanson I.C., Pulsipher M.A., Fuleihan R., Filipovich A., Goldman F., Kapoor N., Small T., Smith A., Chan K.W., Cuvelier G., Heimall J., Knutsen A., Loechelt B., Moore T., Buckley R.H. The natural history of children with severe combined immunodeficiency: baseline features of the first fifty patients of the primary immune deficiency treatment consortium prospective study 6901. *Journal of Clinical Immunology, 2013, Vol. 33, pp. 1156-1164.*

24. Geha R.S., Notarangelo L.D., Casanova J.L., Chapel H., Conley M.E., Fischer A., Hammarström L., Nonoyama S., Ochs H.D., Puck J.M., Roifman C., Seger R., Wedgwood J. Primary immunodeficiency diseases: an update from the International Union of Immunological Societies Primary Immunodeficiency Diseases Classification Committee. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2007, Vol. 120, pp. 776-794.*

25. Harris R, Sawaya GF, Moyer VA, Calonge N. Reconsidering the criteria for evaluating proposed screening programs: reflections from 4 current and former members of the U.S. Preventive Services Task Force. *Epidemiologic Reviews, 2011, Vol. 33, no. 1, pp. 20-35.*

26. Hirschhorn R. Adenosine deaminase deficiency. *Immunodeficiency Reviews, 1990, Vol. 2, no. 3, pp. 175-198.*

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

28. Jilkina O., Thompson J.R., Kwan L., Van Caeseele P., Rockman-Greenberg C., Schroeder M.L. Retrospective TREC testing of newborns with severe combined immunodeficiency and other primary immunodeficiency diseases. *Molecular Genetics and Metabolism Reports, 2014, Vol. 1, pp. 324-333.*

29. Jones J.F., Ritenbaugh C.K., Spence M.A., Hayward A. Severe combined immunodeficiency among the Navajo. I. Characterization of phenotypes, epidemiology, and population genetics. *Human Biology, 1991, Vol. 63, no. 5, pp. 669-682.*

30. Kalman L., Lindegren M.L., Kobrynski L., Vogt R., Hannon H., Howard J.T., Buckley R. Mutations in genes required for T-cell development: IL7R, CD45, IL2RG, JAK3, RAG1, RAG2, ARTEMIS, and ADA and severe combined immunodeficiency: HuGE review. *Genetics in Medicine, 2004, Vol. 6, no. 1, pp. 16-26.*

31. Kwan A., Abraham R.S., Currier R., Brower A., Andruszewski K., Abbott J.K., Baker M., Ballow M., Bartoshesky L.E., Bonilla F.A., Brokopp C., Brooks E., Caggana M., Celestin J., Church J.A., Comeau A.M., Connelly J.A., Cowan M.J., Cunningham-Rundles C., Dasu T., Dave N., De La Morena M.T., Duffner U., Fong C.T., Forbes L., Freedenberg D., Gelfand E.W., Hale J.E., Hanson I.C., Hay B.N., Hu D., Infante A., Johnson D., Kapoor N., Kay D.M., Kohn D.B., Lee R., Lehman H., Lin Z., Lorey F., Abdel-Mageed A., Manning A., McGhee S., Moore T.B., Naides S.J., Notarangelo L.D., Orange J.S., Pai S.Y., Porteus M., Rodriguez R., Romberg N., Routes J., Ruehle M., Rubenstein A., Saavedra-Matiz C.A., Scott G., Scott P.M., Secord E., Seroogy C., Shearer W.T., Siegel S., Silvers S.K., Stiehm E.R., Sugerman R.W., Sullivan J.L., Tanksley S., Tierce M.L. 4th, Verbsky J., Vogel B., Walker R., Walkovich K., Walter J.E., Wasserman R.L., Watson M.S., Weinberg G.A., Weiner L.B., Wood H., Yates A.B., Puck J.M., Bonagura V.R. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States. *Journal of the American Medical Association, 2014, Vol. 312, no. 7, pp. 729-738.*

32. Lebet T., Chiles R., Hsu A.P., Mansfield E.S., Warrington J.A., Puck J.M. Mutations causing severe combined immunodeficiency: detection with a custom resequencing microarray. *Genetics in Medicine, 2008, Vol. 10, no. 8, pp. 575-585.*

33. McGhee S.A., Stiehm E.R., Cowan M., Krogstad P., McCabe E.R. Two-tiered universal newborn screening strategy for severe combined immunodeficiency. *Molecular Genetetics and Metabolism, 2005, Vol. 86, no. 4, pp. 427-430.*

34. Meeths M., Chiang S.C., Wood S.M., Entesarian M., Schlums H., Bang B., Nordenskjöld E., Björklund C., Jakovljevic G., Jazbec J., Hasle H., Holmqvist B.M., Rajic L., Pfeifer S., Rosthøj S., Sabel M., Salmi T.T., Stokland T., Winiarski J., Ljunggren H.G., Fadeel B., Nordenskjöld M., Henter J.I., Bryceson Y.T. Familial hemophagocytic lympho- and histiocytosis type 3 (FHL3) caused by deep intronic mutation and inversion in UNC13D. *Blood, 2011, Vol. 118, pp. 5783-5793.*

35. Moore E.C., Meuwissen H.J. Screening for ADA deficiency. *Journal of Pediatrics, 1974, Vol. 85, no. 6, pp. 802-804.*

36. Morton D.H, Morton C.S., Strauss K.A., Robinson D.L., Puffenberger E.G., Hendrickson C., Kelley R.I. Pediatric medicine and the genetic disorders of the Amish and Mennonite people of Pennsylvania. *American Journal of Medical Genetics, 2003, Vol. 121C, no. 1, pp. 5-17.*

37. Notarangelo L.D., Casanova J.L. Primary immunodeficiencies: increasing market share. *Curr. Opin. Immunol., 2009, Vol. 21, pp. 461-465.*

38. Notarangelo, Luigi D. Primary immunodeficiencies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, Vol. 125, no. 2, pp. S182-S194.*

39. Ochs H.D., Smith C.I.E., Puck J.M. Primary immunodeficiency diseases: a molecular and cellular approach. 2nd ed. New York: Oxford University Press, 2007.

40. Pai S.Y., Logan B.R., Griffith L.M., Buckley R.H., Parrott R.E., Dvorak C.C., Kapoor N., Hanson I.C., Filipovich A.H., Jyonouchi S., Sullivan K.E., Small T.N., Burroughs L., Skoda-Smith S., Haight A.E., Grizzle A., Pulsipher M.A., Chan K.W., Fuleihan R.L., Haddad E., Loechelt B., Aquino V.M., Gillio A., Davis J., Knutsen A., Smith A.R., Moore T.B., Schroeder M.L., Goldman F.D., Connelly J.A., Porteus M.H., Xiang Q., Shearer W.T., Fleisher T.A., Kohn D.B., Puck J.M., Notarangelo L.D., Cowan M.J., O'Reilly R.J. Transplantation outcomes for severe combined immunodeficiency, 2000-2009. *New England Journal of Medicine, 2014, Vol. 371, pp. 434-446.*

41. Parvaneh N., Casanova J.L., Notarangelo L.D., Conley M.E. Primary immunodeficiencies: a rapidly evolving story. *J. Allergy Clin. Immunol., 2013, Vol. 131, no. 2, pp. 314-323.*

42. Picard C., Al-Herz W., Bousfiha A., Casanova J.-L., Chatila T., Conley M.E., Cunningham-Rundles C., Etzioni A., Holland S.M., Klein C., Nonoyama S., Ochs H.D., Oksenhendler E., Puck J.M., Sullivan K.E., Tang M.L.K., Franco J.L., Gaspar H.B. Primary Immunodeficiency Diseases: an Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency 2015. *Journal of Clinical Immunology, 2015, Vol. 35, no. 8, pp. 696-726.*

43. Puck J.M. SCID Newborn Screening Working Group. Population-based newborn screening for severe combined immunode ciency: steps toward implementation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2007, Vol. 120, no. 4, pp. 760-768.*

44. Puck J.M. Laboratory technology for population-based screening for severe combined immunodeficiency in neonates: the winner is T-cell receptor excision circles. *Journal of Allergy and Clinical Immunology, 2012, Vol. 129, no. 3, pp. 607-616.*

45. Roifman C.M., Somech R., Grunebaum E. Matched unrelated bone marrow transplant for T^+ combined immunodeficiency. *Bone Marrow Transplantation, 2008, Vol. 41, pp. 947-952.*

46. Sanchez J.J., Monaghan G., Børsting C., Norbury G., Morling N., Gaspar H.B. Carrier frequency of a nonsense mutation in the adenosine deaminase (ADA) gene implies a high incidence of ADA-deficient severe combined immunodeficiency (SCID) in Somalia and a single, common haplotype indicates common ancestry. *Annals of Human Genetics, 2007, Vol. 71, no. 3, pp. 336-347.*

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

48. Stephan J.L., Vlekova V., Le Deist F., Blanche S., Donadieu J., De Saint-Basile G., Durandy A., Griscelli C., Fischer A. Severe combined immunodeficiency: a retrospective single-center study of clinical presentation and outcome in 117 patients. *Journal of Pediatrics, 1993, Vol. 123, no. 4, pp. 564-572.*
49. Tonegawa S. Somatic generation of antibody diversity. *Nature, 1983, Vol. 302, pp. 575-581.*
50. van der Burg M., Gennery A.R. The expanding clinical and immunological spectrum of severe combined immunodeficiency. *European Journal of Pediatrics, 2011, Vol. 170, no. 5, pp. 561-571.*
51. van der Burg M., Tümkaya T., Boerma M., de Bruin-Versteeg S., Langerak A.W., van Dongen J.J. Ordered recombination of immunoglobulin light chain genes occurs at the IGK locus but seems less strict at the IGL locus. *Blood, 2001, Vol. 97, pp. 1001-1008.*
52. van Zelm M.C., Szczepanski T., van der Burg M., van Dongen J.J. Replication history of B lymphocytes reveals homeostatic proliferation and extensive antigen-induced B cell expansion. *Journal of Experimental Medicine, 2007, Vol. 204, pp. 645-655.*
53. Wilson J.M., Jungner Y.G. Principles and practice of mass screening for disease. *Boletin de la Oficina Sanitaria Panamericana, 1968, Vol. 65, no. 4, pp. 281-393.*
54. Yao C.M., Han X.H., Zhang Y.D., Zhang H., Jin Y.Y., Cao R.M., Wang X., Liu Q.H., Zhao W., Chen T.X. Clinical characteristics and genetic profiles of 44 patients with severe combined immunodeficiency (SCID): report from Shanghai, China (2004-2011). *Journal of Clinical Immunology, 2013, Vol. 33, pp. 526-539.*

Авторы:

Корсунский И.А. *— к.м.н., заведующий клинико-диагностическим центром детской иммунологии и аллергологии ГБУЗ «Детская городская больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия*

Гордукова М.А. — врач клинической и лабораторной диагностики ГБУЗ «Детская городская больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия

Мунблит Д.Б. *— к.м.н., научный сотрудник, кафедра педиатрии и детских инфекционных болезней педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова», Москва, Россия; Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания*

Козлов И.Г. *— д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ «Федеральный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», Москва, Россия*

Продеус А.П. *— д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии, ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова»; руководитель отделения иммунологии и ревматологии, ФГБУ «Федеральный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева»; ГБУЗ «Детская городская больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия*

Корсунский А.А. *— д.м.н., профессор, заведующий кафедрой педиатрии и детских инфекционных болезней педиатрического факультета ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова»; ГБУЗ «Детская городская больница № 9 имени Г.Н. Сперанского ДЗМ», Москва, Россия*

Authors:

Korsunskiy I.A.*, PhD (Medicine), Head, Center of Pediatric Immunology and Allergy, Moscow City Pediatric G. Speransky Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation*

Gordukova M.A.*, Doctor for Clinical Laboratory Diagnostics, Moscow City Pediatric G. Speransky Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation*

Munblit D.B.*, PhD (Medicine), Honorary Research Associate, Department of Pediatrics and Infections in Children, Pediatric Faculty, The First Moscow I. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation; Imperial College London, London, Great Britain*

Kozlov I.G.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pharmacology, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University; Chief, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Federal D. Rogachev Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russian Federation*

Prodeus A.P.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatrics, Russian National Research N.I. Pirogov Medical University; Head of Department of Immunology and Rheumatology, Federal D. Rogachev Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology; Moscow City Pediatric G. Speransky Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation*

Korsunskiy A.A.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pediatrics and Infections in Children, Pediatric Faculty, The First Moscow I. Sechenov Medical University; Moscow City Pediatric G. Speransky Clinical Hospital No. 9, Moscow, Russian Federation*

Поступила 08.02.2017
Отправлена на доработку 22.02.2017
Принята к печати 22.03.2017

Received 08.02.2017
Revision received 22.02.2017
Accepted 22.03.2017

Медицинская иммунология
2017, Т. 19, № 5, стр. 513-520
© 2017, СПб РО РААКИ

Обзоры
Reviews

Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya
2017, Vol. 19, № 5, pp. 513-520
© 2017, SPb RAACI

МЕТОДЫ ГЕМАГГЛЮТИНАЦИИ В ОЦЕНКЕ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВНУТРИВЕННОГО ВВЕДЕНИЯ

Корнилова О.Г., Парамонова Е.В., Нечаев А.В., Кудашева Э.Ю., Борисевич И.В., Кишкурно Н.И.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Проблема безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения особенно остро проявляется в современной фармакотерапии иммунодефицитных состояний, гематологических и неврологических заболеваний, в трансплантологии. На фоне массивных инфузий этих препаратов выявляются осложнения, связанные со спонтанной активацией системы комплемента с образованием анафилатоксинов, активацией калликреин-кининовой, плазминовой систем и системы свертывания крови, изменением реологических свойств крови, инициацией внутрисосудистого гемолиза. У определенных групп пациентов эти осложнения могут быть обусловлены наличием в препаратах иммуноглобулинов человека для внутривенного введения таких антиэритроцитарных антител, как анти-А- и анти-В-гемагглютинины, анти-D-антитела. Для минимизации риска развития возможных нежелательных эффектов при применении к препаратам крови человека предъявляют высокие требования специфической безопасности, одним из показателей которой является содержание антиэритроцитарных антител. Представлен литературный обзор по проблемам изучения содержания анти-А- и анти-В-гемагглютининов и анти-D-антител методами гемагглютинации с целью оценки специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения. Продемонстрированы этапы становления современных стандартов качества препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения по содержанию этих антител. Проведен анализ методов гемагглютинации, применяемых для оценки препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения, выявлены их недостатки и преимущества, рассмотрены различные модификации методов, позволяющие оптимизировать процесс контроля качества препаратов по содержанию гемагглютининов и анти-D-антител. Показана необходимость корректировки норм и совершенствования методов оценки содержания гемагглютининов в препаратах иммуноглобулинов человека с содержанием белка 100 мг/мл. Рассмотрены особенности российских национальных стандартов качества препаратов иммуноглобулинов человека в отношении оценки содержания в них гемагглютининов и анти-D-антител. Сделан вывод, что методы гемагглютинации являются наиболее

Адрес для переписки:
Корнилова Ольга Геннадьевна
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ
119002, Россия, Москва, пер. Сивцев Вражек, 41.
Тел.: 8 (499) 252-75-59.
E-mail: kornilova@expmed.ru

Address for correspondence:
Kornilova Olga G.
Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products
190002, Russian Federation, Moscow, Sivtsev Vrazhek lane, 41.
Phone: 7 (499) 252-75-59.
E-mail: kornilova@expmed.ru

Образец цитирования:
О.Г. Корнилова, Е.В. Парамонова, А.В. Нечаев, Э.Ю. Кудашева, И.В. Борисевич, Н.И. Кишкурно «Методы гемагглютинации в оценке специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 513-520. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-513-520

© Корнилова О.Г. и соавт., 2017

For citation:
O.G. Kornilova, E.V. Paramonova, A.V. Nechaev, E.Yu. Kudasheva, I.V. Borisevich, N.I. Kishkurno "Haemagglutination techniques to evaluate specific safety of human intravenous immunoglobulins", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 513-520. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-513-520

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-513-520

информативными и экономически обоснованными в оценке специфической безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения по содержанию анти-А -и анти-В-гемагглютининов и анти-D-антител.

Ключевые слова: препараты иммуноглобулинов человека, специфическая безопасность, анти-А- и анти-В-гемагглютинины, анти-D-антитела, методы гемагглютинации

HAEMAGGLUTINATION TECHNIQUES TO EVALUATE SPECIFIC SAFETY OF HUMAN INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULINS

Kornilova O.G., Paramonova E.V., Nechaev A.V., Kudasheva E.Yu., Borisevich I.V., Kishkurno N.I.

Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation

Abstract. The safety issues of human intravenous immunoglobulin preparations are particularly important in modern pharmacotherapy for immunodeficiencies, hematologic and neurologic diseases, like as at transplant centers. Upon massive infusions of these media some complications are detected that are associated with spontaneous activation of complement system accompanied by production of anaphylatoxins, as well as activation of kallikrein/kinin, plasmin, and blood coagulation systems, changed blood rheology, initiation of intravascular hemolysis. For distinct groups of patients, these complications may be due to presence of some anti-erythrocyte antibodies (e.g., anti-A and anti-B haemagglutinins, anti-D antibodies) in the intravenous human immunoglobulin preparations.

In the present review article, we show development of current quality standards for human intravenous immunoglobulins based on determination of antibody contents. Antibodies to erythrocytes represent a special safety index aiming to minimize risk of possible adverse effects connected with transfusions of human blood preparations. Different haemagglutination tests were compared to assess contents of anti-A, anti-B haemagglutinins and anti-D antibodies for specific safety of human intravenous immunoglobulins. Analysis of haemagglutination techniques for evaluation of human intravenous immunoglobulin preparations revealed their relative advantages and disadvantages. Various modifications of the methods are discussed, thus allowing to optimize process of quality control for these preparations based on detection of haemagglutinins and anti-D antibodies. We demonstrate a necessity to adjust regulations and to improve evaluation techniques for haemagglutinin determination in human immunoglobulin preparations at amounts of 100 mg/ml of protein. Special features of Russian national quality standards for human immunoglobulin preparations are considered with respect to assessment of haemagglutinins and anti-D contents. One may conclude that haemagglutination methods present the most informative and economically substantiated approach when assessing specific safety of human intravenous immunoglobulins by measuring contents of anti-A, anti-B haemagglutinins, and anti-D antibodies.

Keywords: human immunoglobulin, specific safety, anti-A and anti-B haemagglutinins, anti-D antibodies, haemagglutination assays

Введение

Проблема безопасности препаратов иммуноглобулинов человека для внутривенного введения (ИГЧВВ) особенно остро проявляется в современной фармакотерапии иммунодефицитных состояний, гематологических и неврологических заболеваний, в трансплантологии. За последнее десятилетие значительно расширился список показаний к применению этих препаратов, увеличился диапазон терапевтических доз. Введение препаратов ИГЧВВ в дозах 2 г/кг и более в настоящее время широко практикуют при лечении синдромов Гийена–Барре, Миллера–Фишера [18], болезни Кавасаки [7], вульгарной пузырчатки [13], при пересадке почки у HLA-сенсибилизированных пациентов [15] и др. Гомологичность активных компонентов препаратов ИГЧВВ для пациента позволяет значительно по-

высить терапевтическую эффективность и снизить риск развития аллергических реакций при применении. Однако на фоне массивных инфузий этих препаратов выявляются осложнения, связанные со спонтанной активацией системы комплемента с образованием анафилатоксинов, активацией калликреин-кининовой, плазминовой систем и системы свертывания крови, изменением реологических свойств крови, инициацией внутрисосудистого гемолиза [19]. Эти осложнения могут быть обусловлены остаточным содержанием в готовом препарате таких компонентов плазмы крови, как анти-D антитела, гемагглютинины, активатор прекалликреина, активированные факторы свертывания крови, что связано с невозможностью на этапах технологического процесса полностью исключить контаминацию готовой формы препарата остаточными количествами «нецелевых» белков плазмы крови.

Для минимизации риска развития возможных нежелательных эффектов при применении к препаратам иммуноглобулинов человека предъявляют высокие требования специфической безопасности, которая является характеристикой препаратов ИГЧВВ, основанной на сравнительном анализе эффективности и риска причинения вреда здоровью, связанного с влиянием на системы гемостаза, комплемента и калликреин-кининовую.

Одной из причин гемолитических осложнений иммуноглобулинотерапии у пациентов не 0(I) группы крови и/или резус-положительных является пассивная передача анти-А и анти-В гемагглютининов или анти-D-антител, присутствующих в препаратах ИГЧВВ [7, 9, 10, 15, 16, 18, 23, 31]. Максимально полное сохранение всего спектра иммуноглобулинов класса G, находящихся в плазме крови доноров, приводит к тому, что в препаратах ИГЧВВ содержатся антитела широкого спектра действия, в том числе антиэритроцитарные. Известно, что в плазме доноров I, II и III групп крови содержатся анти-А- и анти-В-гемагглютинины, а в плазме резус-отрицательных доноров выявляются анти-D-антитела. В соответствии с международными и российскими требованиями, препараты ИГЧВВ получают из объединенной плазмы более 1000 доноров [3, 11], что обуславливает высокую вероятность содержания в них анти-А- и анти-В-гемагглютининов, а также анти-D-антител [8]. Количество гемагглютининов и их принадлежность к иммуноглобулинам классов G (IgG) или M (IgM) зависит от превалирования в производственном пуле плазмы доноров с группой крови I(0), II(A) и/или III(B). Соответственно, при большом содержании в производственном пуле плазмы резус-отрицательных доноров в готовом препарате могут выявляться анти-D антитела IgG. Кроме того, результаты исследований Moscow J.A. et al. [17] показали, что, помимо анти-А- и анти-В-гемагглютининов и анти-D-антител, в препаратах ИГЧВВ могут быть обнаружены анти-K-антитела, которые также могут вызывать иммуноопосредованный гемолиз, однако частота их выявления значительно ниже. Таким образом, контроль содержания анти-А- и анти-В-гемагглютининов и анти-D-антител является важной составляющей оценки специфической безопасности препаратов ИГЧВВ.

В трансфузиологии основным методом определения эритроцитарных антигенов (систем ABO, резус) является реакция гемагглютинации. Антитела к этим антигенам также могут быть выявлены методом гемагглютинации с использованием соответствующих тестовых эритроцитов. Скорость и выраженность агглютинации зависят от числа эритроцитов, концентрации антител, температуры и ионной силы раствора. Механизмы протекания реакции прямой гемагглютинации, вызванной иммуноглобулинами различных классов, отличаются: IgM, несущие 10 участков связывания, вызывают агглютинацию эритроцитов даже в физиологическом растворе, а IgG не могут вызвать агглютинацию при непосредственном воздействии, пока отрицательный заряд эритроцитов не будет снижен с помощью какого-либо высокомолекулярного вещества либо не будут удалены сиаловые кислоты для увеличения доступности антигена [2]. Для выявления IgG, которые являются неполными антителами, также применяют метод непрямой гемагглютинации, в ходе которого на первом этапе сенсибилизируют эритроциты гемагглютининами, а уже агглютинация сенсибилизированных происходит вследствие внесения античеловеческого поливалентного иммуноглобулина.

Еще в 70-80-х годах прошлого века, на этапах становления принципов терапии препаратами ИГЧВВ, была выявлена значительная вариабельность содержания в них гемагглютининов и анти-D-антител в зависимости от производителя [21, 22, 26]. Так, содержание анти-А-гемагглютининов могло достигать титра 1:128, анти-В – 1:64, а анти-D-антител – 1:256. При таком содержании антиэритроцитарных антител даже невысокие дозы препаратов ИГЧВВ приводили к возникновению гемолиза у определенных групп пациентов. В связи с этим международными экспертами была признана необходимость нормирования содержания в препаратах ИГЧВВ анти-А- и анти-В-гемагглютининов, а также анти-D-антител.

Методы оценки содержания анти-D-антител в препаратах ИГЧВВ

Исследования, проведенные в 90-х годах прошлого века, когда были проанализированы более 200 серий коммерческих препаратов ИГЧВВ различных производителей, показали, что около 6% из них содержали анти-D-антитела в количестве, превышающем 0,05 МЕ/мл (агглютинация в разведении 1:16 – 1:32) [24, 30]. В качестве положительного контроля использовали разведение внутримышечного антирезусного иммуноглобулина до содержания 0,05 МЕ/мл (Partobulin; Immuno Ltd, Sevenoaks, Kent, UK). Результаты ретроспективного анализа осложнений, возникающих при применении этих серий препаратов ИГЧВВ, свидетельствовали, что инфузии больших объемов препаратов, содержащих более 0,05 МЕ/мл анти-D-антител, сопровождались нежелательными эффектам у резус-положительных пациентов: интраваскулярным гемолизом с резким снижением гемоглобина, гематокрита, ретикулоцитозом, гипербилирубинемией, гемоглобинурией и др. симптомами, вплоть до почечной и полиорганной недостаточности, что более часто встречалось у пациентов с нарушениями иммунной системы.

Для исключения подобных осложнений иммуноглобулинотерапии в международную практику производства препаратов ИГЧВВ с 2006 г. введено нормирование содержания анти-D-антител. Регламентированное Европейской Фармакопеей (ЕФ) содержание анти-D-антител в препаратах ИГЧВВ не должно превышать титр положительного стандарта [11]. Положительный стандарт содержит анти-D-антитела в количестве, соответствующем антирезусной активности 0,0475 МЕ/мл (агглютинация в разведении 1:8). Эта величина расчетная, так как стандарт получен разведением в 6000 раз международного стандарта антирезусного иммуноглобулина с активностью 285 МЕ/мл в растворе иммуноглобулина человека нормального с содержанием белка 50 мг/мл.

Учитывая, что анти-D-антитела являются неполными антителами, принадлежащими к классу IgG, для выявления антиэритроцитарных антител использовали метод непрямой гемагглютинации. Однако дальнейшие исследования специалистов Национального института биологических стандартов и контроля (National Institute for Biological Standards and Control, NIBSC) под руководством Susan J. Thorpe позволили разработать метод оценки содержания анти-D-антител на основе реакции прямой гемагглютинации [11, 19]. Согласно этой методике, для получения адекватного результата необходимо соблюдение ряда условий. Во-первых, предпочтительно использование эритроцитов фенотипа 0R2R2 (ccDEE), но возможно также применение эритроцитов фенотипов 0R1R1 (CCDee) и 0R1R2 (CcDEe). Это обусловлено тем, что минорные антигены c и E системы резус более иммуногены по сравнению с антигенами C и e. Во-вторых, для контроля специфичности анализа следует применять D-отрицательные эритроциты фенотипа 0rr. Поскольку на поверхности эритроцитов с данным фенотипом отсутствует D-антиген, агглютинации эритроцитов быть не должно, однако, при наличии у этих эритроцитов K-антигена возможна слабая агглютинация (не более чем в разведении 1:2) как при использовании положительного стандарта, так и ИГЧВВ. В-третьих, для повышения чувствительности реакции гемагглютинации предусмотрена предварительная обработка эритроцитов протеолитическим ферментом папаином. Вследствие отрицательного поверхностного заряда эритроциты отталкиваются друг от друга, а папаин способствует удалению большинства составляющих клеточной мембраны, обуславливающих ее отрицательный заряд (остатки сиаловых кислот на гликофоринах A, B, C, D) [1]. В мировой практике описаны случаи обработки эритроцитов другими протеолитическими ферментами (трипсин, бромелин), однако для определения неполных анти-D-антител системы резус использование папаина более эффективно [12]. В-четвертых, при проведении испытаний в реакционную среду следует добавлять бычий сывороточный альбумин, который способствует снижению электрической активности поверхности клеток и соответственно возрастает вероятность агглютинации резус-положительных клеток антирезусным IgG [2]. Подготовка испытуемого образца унифицирована для препаратов ИГЧВВ с различным содержанием белка иммуноглобулина таким образом, что разведение до содержания белка в образце 25 мг/мл считают разведением 1:2, даже если это не соответствует действительности. Например, при использовании препаратов ИГЧВВ с содержанием белка 100 мг/мл приготовление образца с содержанием белка 25 мг/мл будет считаться разведением 1:2 [11].

Введение обязательного тестирования на содержание анти-D-антител препаратов ИГЧВВ модифицированным методом прямой гемагглютинации позволило значительно снизить вероятность возникновения обусловленных ими осложнений иммуноглобулинотерапии. Для препаратов ИГЧВВ российского производства в соответствии с требованиями Государственной Фармакопеи XIII издания (ГФ XIII) также является обязательным изучение содержания в них

анти-D-антител [3, 4]. По показателю качества «Анти-D-антитела» отечественные препараты ИГЧВВ не уступают мировым аналогам.

Безусловно, современные достижения в области изучения структуры и функции иммуноглобулинов позволяют определять содержание анти-D-антител в препаратах ИГЧВВ более сложными и точными методами, например проточной цитофлюориметрии, иммуноферментного анализа. Однако их использование неоправданно усложнит контроль препаратов и, соответственно, повысит их себестоимость. Использование единого модифицированного метода гемагглютинации при оценке одного из параметров специфической безопасности препаратов ИГЧВВ всеми мировыми производителями позволяет лечащему врачу сделать рациональный выбор при назначении пациенту.

Методы оценки содержания анти-А- и анти-В-гемагглютининов в препаратах ИГЧВВ

Еще одним показателем специфической безопасности препаратов ИГЧВВ является содержание в них анти-А- и анти-В-гемагглютининов. Международные требования устанавливают допустимый предел содержания гемагглютининов, соответствующий разведению ИГЧВВ 1:64, в котором отсутствует агглютинация тестовых эритроцитов. Эту величину определяют как титр гемагглютининов. Впервые содержание гемагглютининов в препаратах ИГЧВВ было регламентировано в 80-х годах прошлого столетия. Вплоть до 2012 г. в ЕФ был предусмотрен один метод определения – непрямой гемагглютинации. Однако несмотря использование этого метода всеми мировыми производителями при сравнительном исследовании препаратов ИГЧВВ отмечалась значительная вариабельность результатов [6, 27]. По мнению Susan J. Thorpe, метод непрямой гемагглютинации как метод контроля качества препаратов ИГЧВВ имеет значительные недостатки: высокие концентрации гемагглютининов могут нейтрализовать антиглобулиновую сыворотку, неправильно проведенная процедура «отмывания» сенсибилизированных эритроцитов приводит к повреждению структуры их поверхностных антигенов [28]. Эти обстоятельства обуславливают получение заниженных результатов. В то же время использование для контроля реакции клеток Кумбса (сенсибилизированные резус-положительные эритроциты группы 0(I), а также соблюдение режима центрифугирования при подготовке сенсибилизированных эритроцитов позволяют исключить занижение результатов [6]. Тем не менее, специалисты NIBSC под руководством Susan J. Thorpe, учитывая опыт разработки модифицированного метода для оценки содержания анти-D-антител, предложили аналогичный метод оценки содержания гемагглютининов в препаратах ИГЧВВ на основе реакции прямой гемагглютинации [27, 28]. Актуальная версия ЕФ регламентирует использование методов непрямой и прямой гемагглютинации, причем количественное определение рекомендовано в реакции прямой гемагглютинации [11]. Оба метода предусматривают использование эритроцитов группы крови А(II) наиболее иммуногенной подгруппы A_1 для выявления анти-А-гемагглютининов и группы крови В(III) для выявления анти-В-гемагглютининов, а также необходимость разведения испытуемого образца препарата ИГЧВВ до содержания белка иммуноглобулина 30 мг/мл, которое в дальнейшем не учитывается при определении титра. Для повышения чувствительности реакции прямой гемагглютинации также необходима предварительная обработка эритроцитов папаином, а реакционная среда должна содержать бычий сывороточный альбумин. На практике модифицированный метод прямой гемагглютинации также выявил существенный недостаток: момент времени, оптимальный для оценки агглютинации и определения титров гемагглютининов, варьирует в различных лабораториях. С целью устранения вариабельности результатов в методике ЕФ предусмотрено применение стандартных образцов. Положительный и отрицательный стандартные образцы представляют собой раствор иммуноглобулина человека с содержанием гемагглютининов в диапазоне от 1:16 до 1:32 и менее 1:2 соответственно [29]. В случае если препарат ИГЧВВ содержит гемагглютинины более, чем в положительном стандартном образце, проводят еще одно определение с использованием стандартного образца лимита содержания гемагглютининов. Препарат считают не соответствующим требованиям, если в нем содержатся гемагглютинины в титре большем, чем в стандартном образце лимита содержания гемагглютининов. Стандартный образец лимита содержания гемагглютининов применим исключительно в реакции прямой гемагглютинации, так как представляет собой раствор иммуноглобулина человека с добавлением мышиных моноклональных антител для достижения целевого значения 1:64. Мышиный компонент стандартного образца не может быть выявлен в реакции непрямой гемагглютинации.

Европейская Фармакопея предусматривает проведение гемагглютинации макрометодом, т.е. «на плоскости». Субъективность визуальной оценки результатов значительно снижает точность получаемых результатов. Более объективным вариантом метода гемагглютинации является гелевая технология, которая уже широко применяется в трансфузиологии. Для оценки

специфической безопасности препаратов ИГЧВВ по содержанию гемагглютининов ряд исследователей считает применение гелевых карт наиболее оптимальным [6, 25].

Допустимость использования двух методов (прямой и непрямой гемагглютинации) изучения содержания гемагглютининов в препаратах ИГЧВВ не позволяет в полной мере достоверно оценить уровень безопасности применения конкретного препарата, в том числе в сравнении с аналогами. Следует отметить, что усовершенствование метода контроля препаратов ИГЧВВ не привело к снижению количества гемолитических осложнений иммуноглобулинотерапии, связанных с содержанием гемагглютининов [20]. В ряде случаев осложнения были связаны с применением препаратов ИГЧВВ, соответствующих нормативным требованиям по содержанию гемагглютининов, но с более высоким содержанием белка (100 мг/мл) [14, 18]. Инфузии таких препаратов на практике приводит к введению в организм пациента большего количества гемагглютининов, нежели это происходит при применении растворов иммуноглобулинов с содержанием белка 50 мг/мл. Одним из возможных путей решения этой проблемы может быть снижение допустимого предела содержания гемагглютининов в препаратах ИГЧВВ, а также оптимизация методики их определения с учетом исходного содержания белка иммуноглобулина в препарате.

В РФ порядок определения анти-А- и анти-В-гемагглютининов в препаратах ИГЧВВ регламентирует общая фармакопейная статья (ОФС) в составе ГФ XIII [5]. С учетом современных тенденций оптимизации метода гемагглютинации ОФС.1.8.2.0005.15 предусматривает проведение испытаний «на плоскости» или в геле, нормы содержания аналогичны международным требованиям. Для наиболее полного соответствия мировым стандартам необходима стандартизация методики. Однако в разработке стандартного образца для метода непрямой гемагглютинации использование подхода с использованием моноклональных антител, аналогичного NIBSC, неприемлемо. Необходимы иные пути создания стандартных образцов с повышенным содержанием гемагглютининов. Следует отметить, что ОФС.1.8.2.0005.15 содержит только метод непрямой гемагглютинации, чем отличается от монографии ЕФ [11]. Несмотря на возможность использования метода прямой гемагглютинации, среди зарегистрированных в Российской Федерации препаратов ИГЧВВ зарубежного производства только в одном производитель оценивает содержание гемагглютининов этим методом, остальные используют метод непрямой гемагглютинации.

Заключение

Таким образом, методы гемагглютинации являются наиболее информативными и экономически обоснованными в оценке специфической безопасности препаратов ИГЧВВ. Они позволяют оценить содержание анти-А- и анти-В-гемагглютининов, анти-D-антител и исключить применение препаратов, которые могут вызвать гемолитические осложнения. В настоящее время наиболее адекватными считаются методики, предложенные Европейским Директоратом по качеству лекарственных средств в виде соответствующих монографий в составе Европейской Фармакопеи. Однако и они не лишены недостатков, связанных с субъективностью оценки результатов. Это обстоятельство может существенно повлиять на правильность выбора препарата ИГЧВВ при назначении пациенту в зависимости от диагноза, объема инфузий, наличия сопутствующих заболеваний. Дальнейшего изучения требует оценка специфической безопасности препаратов ИГЧВВ с содержанием белка 100 мг/мл. Разработка в Российской Федерации национальных стандартов качества, гармонизированных с международными требованиями по содержанию гемагглютининов и анти-D антител, обуславливает конкурентоспособность отечественных препаратов ИГЧВВ на фармацевтическом рынке.

Список литературы / References

1. Жибурт Е.Б. Трансфузиология: учебник. СПб.: Питер, 2002. 736 с. [Zhiburt E.B. Transfusion Medicine: a textbook]. St. Petersburg: Peter, 2002. 736 p.

2. Жибурт Е.Б., Караваев А.В., Мадзаев С.Р., Губанова М.Н. Особенности национального определения антител к эритроцитам // Вестник Росздравнадзора, 2012. № 4. С. 61-63. [Zhiburt E.B., Karavaev A.V., Mazaev S.R., Gubanov M.N. Features of national definition of antibodies to red blood cells. *Vestnik Roszdravnadzora = Journal of Healthcare, 2012, no. 4, pp. 61-63.* (In Russ.)]

3. Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения: ФС.3.3.2.0008.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание [Электронный ресурс]. [Normal human immunoglobulin for intravenous injection: PA.3.3.2.0008.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. (In Russ.)] URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/ pharmacopoeia_3/HTML/#1244

4. Испытание на анти-D антитела в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека: ОФС.1.8.2.0004.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс]. [Test for anti-D antibodies in medicinal preparations of human immunoglobulin: GPA.1.8.2.0004.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. (In Russ.)] URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#924

5. Определение анти-А и анти-В гемагглютининов в лекарственных препаратах иммуноглобулинов человека: ОФС.1.8.2.0005.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. [Электронный ресурс]. [Determination of anti-A and anti-haemagglutinin in medicinal preparations of human immunoglobulin: GPA.1.8.2.0005.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. (In Russ.)]URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2/HTML/#928

6. Bellac C.L., Polatti D., Hottiger T., Girard P., Sanger M., Gilgen M. Anti-A and anti-B haemagglutinin levels in intravenous immunoglobulins: Are they on the rise? A comparison of four different analysis methods and six products. *Biologicals, 2014, Vol. 42, pp. 57-64.*

7. Berard R., Wittemore B., Scuccimarri R. Hemilytic anemia following intravenous immunoglobulin therapy in patients treated for Kawasaki disease: a report of 4 cases. *Pediatric Rheumatology, 2012, Vol. 10, no. 1, p. 10.*

8. Branch D.R. Anti-A and anti-B: what are they and where do they come from? *Transfusion, 2015, Vol. 55, pp. S75-S79.*

9. Darling L., Puget S. Haemolysis And IVIG: Why This Side Effect Increases And How To Prewents it in Dysimmune Neuropathies? *Meeting Abstracts, p.131.* URL:http://static1.squarespace.com/static/53e0d272e4b0ea4fa48a8d40/t/5583e600e4b0b30480059c63/1434707456553/2015+PNS+Program+11June2015.pdf

10. Daw Z., Padmore R., Neurath D., Cober N., Tokessy M., Desjardins D., Olberg B., Tinmouth A., Giulivi A. Hemolytic transfusion reactions after administration of intravenous immune (gamma) globulin: a case series analysis. *Transfusion, 2008, Vol. 48, pp. 1598-1601.*

11. European Pharmacopoeia [Электронный ресурс]: EDQM. 8th Ed. Доступ по подписке. URL: http://online6.edqm.eu/ep801/#

12. Hekker A.C., Klomp-Magnee W., Krijnen H.W., van Loghem J.J.Jr. A Papain Slide Test for Rh Mass Typing. *Vox Sang, 1957, Vol. 2, pp. 128-133.*

13. Jolles S., Sewell W.A.C., Misbah S.A. Clinical uses of intravenous immunoglobulin. *Clinical and Experimental Immunology, 2005, Vol. 142, pp. 1-11.*

14. Jordan S., Hsi R., Abumuhor I., Klapper E., Vo A. Assessment of Anti-A and Anti-B Antibody Titers in Different IVIG Preparations: Correlation with Risk for Hemolysis [abstract]. *Am J. Transplant., 2013, Vol. 13, Suppl. 5.*

15. Kahwaji J., Barker E., Pepkowitz S., Klapper E., Villicana R., Peng., Chang R., Jordan S.C., Vo A.A. Acute hemolysis after high-dose intravenous immunoglobulin therapy in highly HLA sensitized patient. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol., 2009, Vol.4, no. 12, pp.1993-1997.*

16. Kimber M.C. PPTA Publishes Qualitative Analyses of IVIG-Associated Hemolysis Case Series. *Fall 2015. The Source, pp. 27-28.*

17. Moscow J.A., Casper A.J., Kodis C., Fricke W.A. Positive direct antiglobulin test results after intravenous immune globulin administration. *Transfusion, 1987, Vol. 27, pp. 248-249.*

18. Nguyen T.P., Biliciler S., Wahed A., Sheikh K. Occurrence of hemolytic anemia in patients with GBS treated with high-dose IVIg. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflamm., 2014, Vol. 1, p. 50.*

19. NIBSC. Red cell immunohaematology. URL: http://www.nibsc.org/ science_and_research/biotherapeutics/red_cell_immunohaematology.aspx

20. NIBSC. Therapeutic immunoglobulins. URL: http://www.nibsc.org/science_and_research/biotherapeutics/large_volume_parenteral_medicines/therapeutic_immunoglobulins.aspx

21. Niosi Ph., Lundberg J., McCullough, Park B.H., Biggar D.W. Blood-Group Antibodies in Human Immune Serum Globulin [letter]. *The New England Jornal of Medicine, 1971, pp. 1435-1436.*

22. Oberman H.A., Beck M.L. Red blood cell sensitization due to unexpected Rh antibodies in immune serum globulin. *Transfusion, 1971, Vol. 11, pp. 382-384.*

23. Padmore R. Possible mechanisms dor intravenous immunoglobulin-assotiated hemolysis: clues obtained from review of clinical case reports. *Transfusion, 2015, Vol. 55, pp. S59-S64.*

24. Pisani G., Wirz M., Gentili G. Anti-D testing in intravenous immunoglobulins: shouldn't it be considered? [Letter]. *Vox. Sang, 1996, Vol. 71, p. 132.*

25. Siani B., Willimann K., Wymann S., Marques A.A., Widmer E. Isoagglutinin reduction in human immunoglobulin products by donor screening. *Biol. Ther., 2014, Vol. 4, no, 1-2, pp. 15-26.*

26. Steiner E.A., Butch S.H., Carey J.L., Oberman H.A. Passive anti-D from intravenous immune serum globulin [Letter]. *Transfusion, 1983, Vol. 23, p. 363.*

27. Thorpe S.J. Specifications for anti-A and anti-B in intravenous immunoglobulin: history and rationale. *Transfusion, 2015, Vol. 55, pp. S80-S85.*

28. Thorpe S. J., Fox B.J., Dolman C.D., Thorpe R. Anti-A and anti-B activity in batches of different intravenous immunoglobulin products determined using a direct haemagglutination method. *Biologicals, 2005, Vol. 33, pp. 111-116.*

29. Thorpe S.J., Fox B., Sharp G., Heath A.B., Behr-Gross M.-E., Terao E., Virata-Theimer M.L., Yu M.W. International collaborative study to evaluate candidate reference reagents to standardize haemagglutination testing for anti-A and anti-B in normal intravenous immunoglobulin products. *Vox Sang, 2009, Vol. 97, pp. 160-168.*

30. Turner C.E., Thorpe S., Brasher M. Anti–Rh D Activity of Commercial Intravenous Immunoglobulin Preparations. *Vox Sang, 1999, Vol. 76, pp. 55-58.*

31. Wilson J.R., Bhoopalam N., Fisher M. Hemolytic anemia associated with intravenous immunoglobulin. *Mucle and Nerve, 1997, Vol. 20, pp.1142-1145.*

Авторы:

Корнилова О.Г. *— к.м.н., эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Парамонова Е.В. *— эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Нечаев А.В. *— эксперт лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Кудашева Э.Ю. *— к.м.н., начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Борисевич И.В. *— д.м.н., профессор, директор Центра планирования и координации научно-исследовательских работ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Кишкурно Н.И. *— старший специалист по интеллектуальной собственности отдела редакционно-издательской деятельности и защиты интеллектуальной собственности Центра планирования и координации научно-исследовательских работ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Authors:

Kornilova O.G.*, PhD (Medicine), Expert, Laboratory of Immunoglobulin and Blood Preparations, Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Paramonova E.V.*, Expert, Laboratory of Immunoglobulin and Blood Preparations, Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Nechaev A.V.*, Expert, Laboratory of Immunoglobulin and Blood Preparations, Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Kudasheva E.Yu.*, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunoglobulin and Blood Preparations, Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Borisevich I.V.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Center for Research Planning and Coordination, Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Kishkurno N.I. *— Senior Specialist of Intellectual Property Division for Publishing Activity and Protection of Intellectual Property, Center for Research Planning and Coordination, Research Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Поступила 26.01.2017
Отправлена на доработку 09.02.2017
Принята к печати 02.03.2017

Received 26.01.2017
Revision received 09.02.2017
Accepted 02.03.2017

ВЛИЯНИЕ АРГИНИНДЕИМИНАЗЫ *STREPTOCOCCUS PYOGENES* НА МИГРАЦИОННУЮ АКТИВНОСТЬ И СТРУКТУРУ ЦИТОСКЕЛЕТА ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЧЕЛОВЕКА

Старикова Э.А.[1], Маммедова Дж.Т.[2], Бурова Л.А.[1], Соколов А.В.[1, 3], Васильев В.Б.[1, 3], Фрейдлин И.С.[1, 3, 4]

[1] ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины», Санкт-Петербург, Россия
[2] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия
[3] ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия
[4] ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия

Резюме. В последнее время в литературе накапливается все больше данных о цитопатическом влиянии бактериальной аргининдеиминазы на эндотелиальные клетки человека, однако точные механизмы эндотелиальной дисфункции, вызванной активностью фермента, остаются слабоизученными. Активность аргининдеиминазы истощает запасы аргинина в микроокружении клеток в различных тканях организма-хозяина. Исходя из данных о том, что аргинилирование белков актинового цитоскелета регулирует их функции, мы предположили, что цитопатическое действие аргининдеиминазы *S. pyogenes* в отношении эндотелиальных клеток может быть связано с нарушением структуры их цитоскелета. Целью исследования было изучение влияния аргининдеиминазы *S. pyogenes* на миграционную активность и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток линии EA.hy926. В работе использовали супернатанты разрушенных *S. pyogenes* M49-16 и его изогенного мутанта с делецией гена аргининдеиминазы *S. pyogenes* M49-16delAD, а также супернатанты разрушенных *S. pyogenes* M22 и аргининдеиминазу, выделенную из стрептококков этого штамма. Влияние бактериальных компонентов на миграционную активность эндотелиальных клеток изучали в модели «раны» *in vitro*. Для анализа влияния бактериальных компонентов на структуру актинового цитоскелета проводили окрашивание клеток фаллоидин-родамином. Было показано, что супернатанты разрушенных *S. pyogenes*, так же как выделенная из супернатанта аргининдеиминаза, вызывали достоверное снижение миграционной активности эндотелиальных клеток и изменения структуры их актинового цитоскелета. Супернатант разрушенных *S. pyogenes* M49-16delAD с делецией гена аргининдеиминазы отличался достоверно ослабленной способностью подавлять миграцию клеток по сравнению с супернатантом разрушенных *S. pyogenes* M49-16. Это различие между штаммами не сопровождалось существенными различиями в характере влияния на структуру актиновых филаментов у клеток, культивируемых в присутствии соответствующих супернатантов. Добавление экзогенного аргинина в культуру клеток, содержащую супернатанты разрушенных *S. pyogenes*, не приводило к восстановлению их миграционной активности и структуры актинового цитоскелета. Однако при добавлении аргинина в культуру клеток, содержащую выделенную из сунернатанта аргининдеиминазу, миграционная активность клеток достоверно усиливалась, а структура актинового цитоскелета эндотелиальных клеток восстанавливалась. Снижение миграционной активности эндотелиальных клеток под влиянием стрептококковой аргинидеиминазы сопряжено с нарушением структуры их актинового цитоскелета на фоне деплеции аргинина.

Ключевые слова: S. pyogenes, аргининдеиминаза, эндотелиальные клетки, метаболизм аргинина, миграция, цитоскелет

Адрес для переписки:
Старикова Элеонора Александровна
ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»
197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. акад. Павлова, 12.
Тел.: 8 (812) 234-68-68.
Факс: 8 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Address for correspondence:
Starikova Eleonora A.
Institute of Experimental Medicine
197376, Russian Federation, St. Petersburg, Acad. Pavlov str., 12.
Phone: 7 (812) 234-68-68.
Fax: 7 (812) 234-94-89.
E-mail: Starickova@yandex.ru

Образец цитирования:
Э.А. Старикова, Дж.Т. Маммедова, Л.А. Бурова, А.В. Соколов, В.Б. Васильев, И.С. Фрейдлин «Влияние аргининдеиминазы Streptococcus pyogenes на миграционную активность и структуру цитоскелета эндотелиальных клеток человека» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 521-528.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-521-528

© Старикова Э.А. и соавт., 2017

For citation:
E.A. Starikova, J.T. Mammedova, L.A. Burova, A.V. Sokolov, V.B. Vasilyev, I.S. Freidlin "Effect of arginine deiminase from Streptococcus pyogenes on cytoskeleton structure and migration activity of human endothelial cells", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 521-528.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-521-528

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-521-528

EFFECT OF ARGININE DEIMINASE FROM *STREPTOCOCCUS PYOGENES* ON CYTOSKELETON STRUCTURE AND MIGRATION ACTIVITY OF HUMAN ENDOTHELIAL CELLS

Starikova E.A.[a], Mammedova J.T.[b], Burova L.A.[a], Sokolov A.V.[a, c], Vasilyev V.B.[a, c], Freidlin I.S.[a, c, d]

[a] *Institute of Experimental Medicine, St. Petersburg, Russian Federation*
[b] *St. Petersburg State Technological University, St. Petersburg, Russian Federation*
[c] *St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation*
[d] *Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg, Russian Federation*

Abstract. There is a growing body of data about the cytopathic effect of bacterial arginine deiminase on human endothelial cells, but the precise mechanisms of endothelial dysfunction caused by the activity of the enzyme remain poorly understood. Activity of arginine deiminase causes arginine depletion in the microenvironment of the host organism cells. In view that arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton structure and cell motility, we proposed that the cytopathic effect of arginine deiminase may be associated with disruption of actin in the cytoskeleton of endothelial cells. The aim of this study was to investigate the effect of arginine deiminase from *S. pyogenes* on migration and actin cytoskeleton structure of the human endothelial cells, line EA.hy926. The supernatant of sonicated *S. pyogenes* M49-16, its isogenic mutant with a deletion of the arginine deiminase gene (*S. pyogenes* M49-16delAD), supernatant of sonicated *S. pyogenes* M22, and arginine deiminase isolated from the latter strain were used. The effect of bacterial factors on migration activity of endothelial cells was studied in the model of "wound healing" *in vitro*. To analyze the influence of bacterial factors on the actin cytoskeleton structure, cells were stained with phalloidin-rhodamine. It was shown that supernatants of destroyed *S. pyogenes*, as well as arginine deiminase significantly reduced the migration activity of endothelial cells and altered the structure of their actin cytoskeleton. The supernatants of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD with deleted gene of arginine deiminase showed a significantly reduced ability to suppress cell migration as compared with the supernatant of sonicated *S. pyogenes* M49-16. No significant differences were revealed in the structure of actin filaments in cells cultured in the presence of supernatants of destroyed *S. pyogenes* M19-16, and cells cultured in the presence of isogenic mutant *S. pyogenes* M49-16delAD. Adding exogenous arginine to the cells cultured with supernatants of destroyed *S. pyogenes* did not restore their migratory activity and the structure of their actin cytoskeleton. However, if arginine deficiency caused by the activity of arginine deiminase was compensated, endothelial cells migration activity was restored, and the structure of actin cytoskeleton was recovered. A decrease of migration activity of endothelial cells under the influence of streptococcal arginine deiminase was due to the disruption of actin cytoskeleton structure.

Keywords: S. pyogenes, arginine deiminase, endothelial cells, arginine metabolism, cell migration, cytoskeleton

Введение

Streptococcus pyogenes – стрептококк группы А (СГА), является одним из основных бактериальных патогенов, колонизирующих слизистую верхних дыхательных путей и эпителий кожи, а также обуславливающих ряд гнойных инфекций и их осложнений у человека [7]. В последние годы отмечаются подъем заболеваемости стрептококковой инфекцией и циркуляция штаммов СГА, характеризующихся повышенной патогенностью. На общем фоне высокого уровня заболеваний верхних дыхательных путей регистрируются тяжелые формы инвазивных стрептококковых заболеваний, такие как: сепсис, синдром токсического шока, токсические формы скарлатины и некротические фасциты [3].

Одним из факторов патогенности *S. pyogenes* является аргининдеиминаза (АД). АД катализирует необратимый гидролиз аргинина с образованием цитруллина и аммиака, является одним из трех ферментов, образующих систему АД у бактерий. Система АД защищает бактерии от кислой среды микроокружения, помогая бактериям выживать в очаге воспаления и фаголизосомах [8, 9, 24]. АД может оказывать цитопатическое действие на клетки организма-хозяина, что подтверждают многочисленные исследования *in vitro*. Наши собственные исследования [1, 20], а также данные других авторов [4, 15, 22] показывают, что АД влияет на функциональную активность эндотелиальных клеток: подавляет их пролиферацию, адгезию, миграцию, формирование капилляроподобных структур, а также ангиогенез *in vivo*. Механизмы действия, лежащие в основе обнаруженных эффектов, изучены недостаточно. Между тем, в литературе накапливается все больше данных, указывающих на взаимосвязь метаболизма аргинина с регуляцией структуры цитоскелета. Многие белки, в том числе белки цитоскелета, в естественных условиях являются аргинилированными. Посттрансляционное арги-

нилирование белков – перенос аргинина с тРНК на N-концевые остатки аминокислот (аспарагиновой кислоты, глутамина и цистеина) осуществляет фермент аргинил-тРНК-трансфераза (ATE1) [23]. Аргинилирование актина может быть одним из механизмов регуляции клеточной миграции. На культуре клеток фибробластов было показано, что аргинилирование β-актина регулирует образование ламелл, внутриклеточной актиновой сети и структуру движущего края клеток. Недостаток аргинилированных белков приводит к дефектам формирования актиновой сети, к резкому снижению уровня полимерного актина, укорочению актиновых фибрилл и формированию агрегатов актина [10, 11, 19].

Аргинин является физиологическим субстратом для синтеза NO и полиаминов [13, 15, 16]. Возможно, цитопатические эффекты АД связаны со снижением продукции этих молекул. Доказательством этого служат данные о способности АД подавлять продукцию NO и регулировать миграцию эндотелиальных клеток. В экспериментах с эндотелиальными клетками линии TR-BBB индуцированная под влиянием провоспалительных цитокинов iNOS-зависимая продукция NO полностью ингибировалась после воздействия АД и полностью восстанавливалась при добавлении в культуральную среду экзогенного аргинина [5]. Показано, что миграция клеток эпителия кишечника связана с аргинин-зависимой продукцией клетками NO, активностью FAK – киназы фокальных контактов [17] и киназой pp70s6k – ключевым регулятором 5' – концевой олигопиримидин mRNA трансляции [18]. Полиамины синтезируются во всех типах клеток и участвуют в процессах транскрипции, трансляции и репликации [6]. От синтеза полиаминов зависит миграция клеток кишечного эпителия [17], а снижение уровня синтеза полиаминов подавляет формирование ламеллиподий и стресс-волокон в мигрирующих клетках [13, 21].

Цель данного исследования состояла в оценке влияния АД *S. pyogenes* на миграционную активность и структуру актинового цитоскелета эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926. Для этого проводили сравнительное изучение влияния на исследуемые процессы супернатантов разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* типа M49 (штамм 16) и его изогенного мутанта с делецией гена АД (49-16delAD) [2], а также влияния супернатанта разрушенных ультразвуком *S. pyogenes* типа M22 (штамм AL 168) и АД, выделенной из этого супернатанта.

Материалы и методы

Культура клеток эндотелия

В работе использовали эндотелиальные клетки человека перевиваемой линии EA.hy926, любезно предоставленные доктором Cora-Jean S. Edgell (Университет Северная Каролина, США). Линия воспроизводит основные фенотипические и функциональные характеристики эндотелиальных клеток макрососудов человека. Клетки культивировали в среде DMEM с F12 («Биолот»), с добавлением 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки (Sigma), 50 мкг/мл сульфата гентамицина, 2 мМ L-глутамина-все («Биолот»), при 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO_2. Пересев производили 1 раз в 3-4 дня с кратностью 1:3. Дезинтеграцию монослоя клеток вызывали инкубацией в растворе Версена («Биолот»).

Приготовление супернатантов разрушенных стрептококков

Супернатанты разрушенных стрептококков (СРС): *S. pyogenes* тип M22, *S. pyogenes* тип M49-16, и его изогенного мутанта с делецией гена АД (M49-16delAD), содержащие биологически активные внутриклеточные компоненты, были приготовлены, как описано нами ранее [20]. СРС вносили в культуры в максимальном нетоксичном для клеток разведении – 1/50, апробированном в наших предыдущих исследованиях [1].

Выделение аргининдеиминазы из супернатанта разрушенных *S. pyogenes* тип M22

Для выделения АД использовали последовательные хроматографии: ионообменную хроматографию на UNO-Sphere Q, гель-фильтрацию на Sephacryl S-200 HR и аффинную хроматографию на Аргинин-Сефарозе. Колонку с UNO-Sphere Q (18 × 2,5 см) уравновешивали PBS разбавленным в 5 раз водой (PBS/5), наносили СРС, разбавленный в 5 раз водой, промывали балластные белки PBS/5 и элюировали белки линейными градиентами по 40 мл от PBS/5 до PBS и по 50 мл от PBS до 1M NaCl. Фракции, содержавшие активность АД, концентрировали до 0,7 мл на ячейке VivaSpin20 (с пределом концентрирования 30 кДа) и наносили на колонку с Sephacryl S-200 HR (115 × 1 см), уравновешенную PBS. Фракции, содержавшие активность АД, разбавляли в 5 раз водой и наносили на колонку с Аргинин-Сефарозой (5 × 1 см), уравновешенную PBS/5, белки элюировали с колонки ступенчатым градиентом по 5 мл PBS/5, PBS/4, PBS/3, PBS/2 и PBS. Фракция (PBS/2), содержавшая активность АД, была сконцентрирована на ячейке VivaSpin20 до 1,2 мл. Аликвота (10 мкг) чистого фермента была использовала для повторного масс-спектрометрического анализа, а к оставшимся 140 мкг АД было добавлено 100 мг BSA для стабилизации белка, как описано в [20]. Бактериальный фермент вносили в культуры клеток в концентрации – 3 мкг/мл, что соответствовало концентрации этого фермента в культуре клеток при внесении СРС в разведении 1/50.

Анализ структуры актинового цитоскелета

Для анализа структуры актинового цитоскелета суспензию эндотелиальных клеток в концентрации 10 тыс. в 300 мкл полной культуральной среды вносили в 6-луночные плоскодонные планшеты (Sarstedt), на дно которых были предварительно помещены стерильные обезжиренные покровные стекла. Одновременно вносили

исследуемые вещества. Клетки инкубировали 72 часа при температуре 37 °С, во влажной атмосфере с 5% CO_2. По окончании инкубации среду удаляли. Покровные стекла фиксировали в 50 мкл 4% формальдегида 10 мин при 25 °С. Фиксатор удаляли и 3 раза промывали PBS. Пермеабилизацию клеток производили 0,01% раствором Тритона X-100 (Sigma) 5 мин при 25 °С. После этого детергент удаляли и стекла 3 раза промывали PBS. Далее вносили 50 мкл раствора родаминфаллоидина на 3,3% метаноле (Invitrogen), в концентрации 6,7 ЕД/мл, (0,22 μM), инкубировали в термостате 10 мин при температуре 37 °С, 3 раза промывали PBS, высушивали и наносили среду для заключения, содержащую краситель для ядер DAPI (Invitrogen). Препараты анализировали с помощью микроскопа AxioObserver. D1 (Zeiss) и программы AxioVisionRel. 4.7 (Zeiss).

Анализ миграционной активности клеток в модели «раны» *in vitro*

Для анализа миграционной активности суспензию клеток вносили в 96-луночные планшеты (Sarstedt) по 25 тыс. клеток в 100 мкл полной культуральной среды. Клетки инкубировали 24 часа при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO_2 до образования конфлюэнтного монослоя. После этого монослой частично разрушали пластиковым наконечником («рана») и проводили однократную отмывку 100 мкл полной культуральной среды. Далее в лунки вносили по 100 мкл полной культуральной среды, содержащей 2,5% ЭТС. Одновременно вносили исследуемые субстанции. После чего клетки инкубировали 24 часа при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5% CO_2. По окончании инкубации среду удаляли. Клетки фиксировали 5 мин в 50 мкл 10% раствора кристаллического фиолетового в метаноле при комнатной температуре. По окончании инкубации избыток красителя удаляли трехкратной отмывкой дистиллированной водой. После этого производили фотографирование лунок. Размеры свободной от клеток площади оценивали с помощью программы AxioVisionRel. 4.7 (Zeiss). Результат выражали в процентах, принимали за 100% среднее значение площади, свободной от клеток в контрольных лунках.

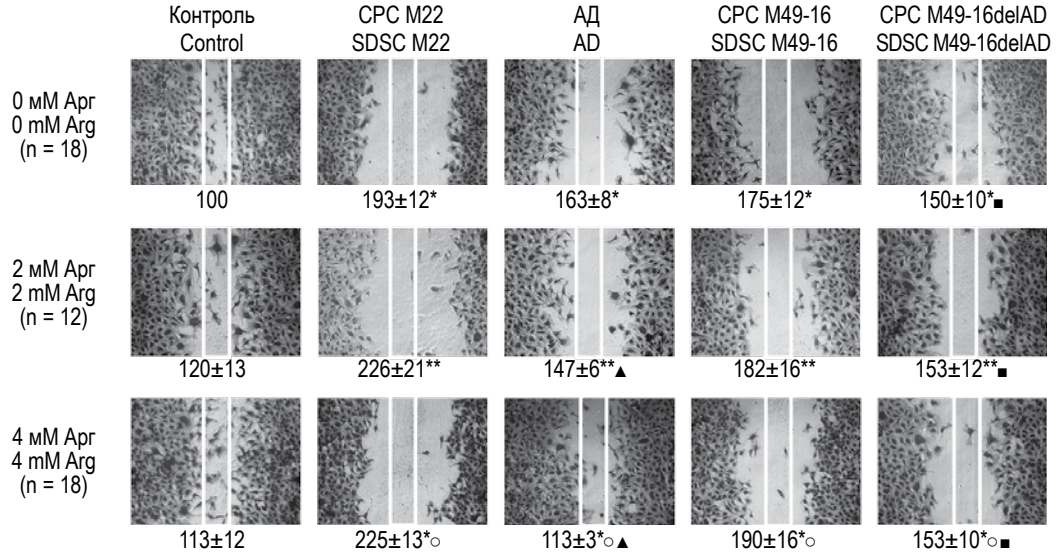

Рисунок 1. Влияние супернатантов разрушенных *S. pyogenes* и АД на интенсивность миграции эндотелиальных клеток линии EA. hy926

Примечание. Значения площади, свободной от клеток (M±SD) %.
*** – отличия от контроля достоверны при p < 0,001;**
□ – отличия от контроля в присутствии 2 мМ аргинина достоверны при p < 0,001;
○ – отличия от контроля в присутствии 4 мМ аргинина достоверны при p < 0,001;
▲ – миграция клеток в присутствии АД достоверно ниже, чем миграция клеток в присутствии АД и аргинина, при p < 0,05;
■ – миграция клеток в присутствии CPC *S. pyogenes* тип M49-16 достоверно ниже, чем миграция клеток в присутствии CPC *S. pyogenes* тип M49-16 delAD, при p < 0,01.

Figure 1. EA.hy926 cell migration in the presence of supernate of destroyed *S. pyogenes* and arginine deiminase

Note. Cells stained with crystal violet dye; 100× magnification. Data are shown as mean values of cell-free areas (M±m), 100% – mean value of the cell-free area in the control;

* – significant difference from control at, p < 0.001;

□ – significant difference from control with 2 мМ arginine, p < 0.001;

○ – significant difference from control with 4 мМ arginine, p < 0.001;

▲ – cell migration in the presence of AD was significantly lower than cell migration in the presence of AD and arginine, p < 0.05;

■ – cell migration in the presence of supernatant of destroyed *S. pyogenes* M49-16 was significantly lower than cell migration in the presence of supernatant of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD, p < 0.01.

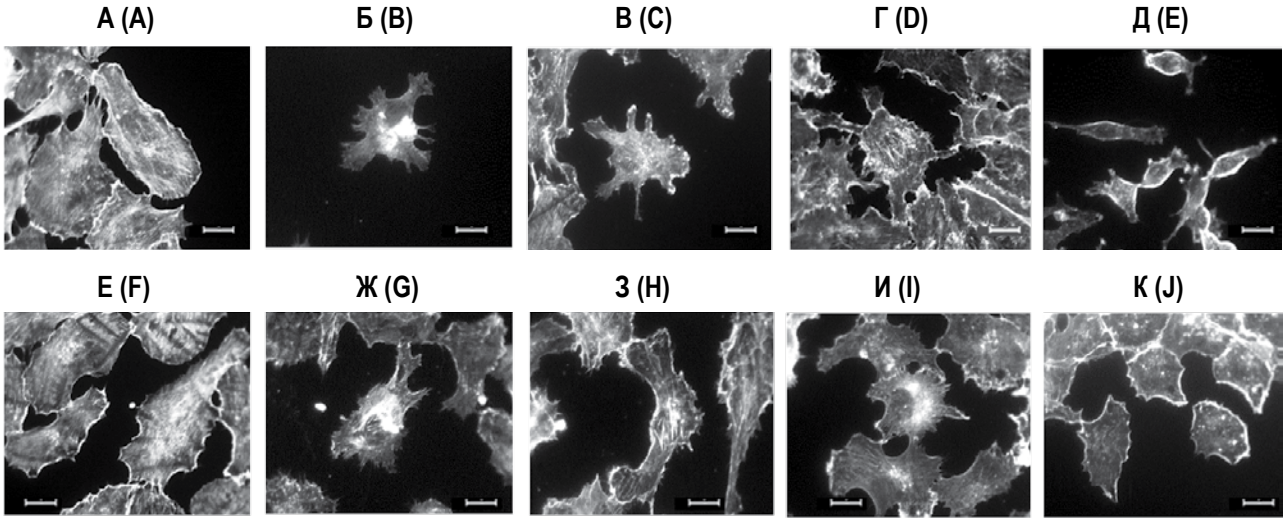

Рисунок 2. Влияние супернатантов разрушенных *S. pyogenes* и АД на морфологию и структуру актинового цитоскелета клеток линии EA.hy926

Примечание. Окраска DAPI (ДНК) и родамин-фаллоидин (F-актин); увеличение в 400 раз.
А – культуральная среда (контроль);
Б – СРС *S. pyogenes* M22; В – СРС *S. pyogenes* M49-16wt; Г – СРС *S. pyogenes* M49-16delAD; Д – 3 μg/ml АД; Е – культуральная среда с добавлением 4 мМ аргинина; Ж – СРС *S. pyogenes* M22 с добавлением 4 мМ аргинина; З – СРС *S. pyogenes* M49-16wt с добавлением 4 мМ аргинина; И – СРС *S. pyogenes* M49-16delAD с добавлением 4 мМ аргинина; К – 3 μg/ml АД с добавлением 4 мМ аргинина.

Figure 2. EA.hy926 cell morphology and actin cytoskeleton structure in the presence of supernatant of destroyed *S. pyogenes* and arginine deiminase

Note. Cells stained with DAPI (DNA) and phalloidin-rhodamine (F-actin) ; 400× magnification:
A – cell culture medium (control); B – supernate of destroyed *S. pyogenes* M22; C – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16wt; D – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD; E – 3 μg/ml AD; F – cell culture medium and 4 мМ arginine; G – supernate of destroyed *S. pyogenes* M22 and 4 мМ arginine; H – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16wt and 4 мМ arginine; I – supernate of destroyed *S. pyogenes* M49-16delAD and 4 мМ arginine; J – 3 μg/ml AD and 4 мМ arginine.

Статистическая обработка данных

Анализ и обработку данных производили с помощью программы STATISTICA 5.0 с использованием t-критерия Стьюдента.

Результаты

Анализ миграционной активности эндотелиальных клеток линии EA.hy926 в модели «раны» *in vitro*.

Исследования показали, что культивирование клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16 и *S. pyogenes* M49-16delAD приводило к достоверному снижению их миграционной активности (рис. 1). При этом подавление миграции клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16delAD (изогенный мутант с делецией гена АД) было выражено достоверно слабее, чем подавление миграции в присутствии СРС исходного штамма (*S. pyogenes* M49-16). Так, площадь, свободная от клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16, составляла 168%, а в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16delAD – 150% ($p < 0,001$).

СРС *S. pyogenes* M22 и АД, выделенная из этого СРС, также подавляли миграцию эндотелиальных клеток. При этом площадь «раны» в присутствии СРС *S. pyogenes* M22 была на 93%, а в присутствии АД на 63% больше, чем в контроле ($p < 0,001$).

Для проверки предположения, что именно дефицит аргинина приводит к подавлению миграции эндотелиальных клеток в среду, содержащую СРС, добавляли экзогенный аргинин. Результаты экспериментов показали, что сам аргинин в концентрации 2 мМ и 4 мМ не оказывал заметного влияния на миграционную активность клеток. В том случае, когда экзогенный аргинин добавляли к клеткам одновременно с СРС *S. pyogenes,* происходило достоверное снижение интенсивности их миграции по сравнению с интенсивностью миграции клеток, которые культивировались в присутствии СРС *S. pyogenes* без добавления аргинина. Однако в том случае, когда экзогенный аргинин добавляли к клеткам, культивируемым в присутствии АД, напротив, происходило ускорение заполнения площади экспериментальной «раны» до значений в контроле. Площадь «раны» в присутствии АД составила 163%, а при добавлении аргинина и АД – 113% ($p < 0,001$).

Анализ структуры актинового цитоскелета

Эндотелиальные клетки в стандартных условиях культивирования имели преимущественно овоидную форму или полигональную форму (рис. 2А). Актиновый цитоскелет был представлен хорошо структурированными фибриллами, клетки формировали широкие ламеллы с выра-

женным по краю кортикальным актином и фокальными контактами.

Существенных различий между эффектами СРС *S. pyogenes* M49-16 и M49-16delAD обнаружено не было. В присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16 (рис. 2В), а также в присутствии СРС его изогенного мутанта M49-16delAD (рис. 2Г) происходило заметное уменьшение размера клеток. При этом также значительно снижалось количество актиновых стресс-фибрилл, их расположение в клетке становилось более хаотично, чем в контроле. В большинстве клеток не происходило формирования ламеллы, края клеток становились сильно изрезанными и образовывали большое количество филоподий.

Культивирование клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M22 (рис. 2Б) тоже приводило к уменьшению размеров и изменению формы клеток по сравнению с контролем. Значительно снижалось количество фибриллярного актина. Клетки в подавляющем большинстве образовывали многочисленные выросты с филоподиями, но теряли способность к формированию ламеллиподий.

В присутствии АД изменения структуры актинового цитоскелета эндотелиальных клеток были более выраженными (рис. 2Д). Происходило сильное уменьшение размера клеток (в несколько раз по сравнению с контролем). Форма клеток становилась фибробластоподобной, практически отсутствовал фибриллярный актин, ламеллиподии не образовывались.

Для проверки зависимости обнаруженных изменений от дефицита аргинина в культуральную среду, содержащую бактериальные компоненты, добавляли 4 мМ аргинина. Добавление аргинина в стандартных условиях культивирования (культуральная среда без добавок) не приводил к значительным изменениям морфологии клеток, однако при этом увеличивалось количество клеток, в которых формировались раффлы (рис. 2Е). Добавление аргинина в культуральную среду, содержащую СРС стрептококков (рис. 2Ж, З, И), приводило к увеличению в клетках количества фибриллярного актина и к частичному восстановлению их способности формировать ламеллиподии. Появление большего количества клеток, имеющих ровный край и широкие ламеллы, указывало на восстановление их способности к миграции. В том случае, когда экзогенный аргинин добавляли к клеткам, культивируемым в присутствии АД (рис. 2К), происходило заметное восстановление размера и формы клеток, однако клетки по-прежнему не формировали ламеллиподии, актин был представлен только в виде гранул.

Обсуждение

В настоящем исследовании при сравнительном изучении эффектов СРС *S. pyogenes* и АД, выделенной из СРС стрептококков, было показано выраженное подавление миграционной активности эндотелиальных клеток в присутствии СРС *S. pyogenes* M49-16, M22 и чистого фермента. В то же время СРС *S. pyogenes* с делецией гена АД M49-16delAD подавлял миграционную активность эндотелиальных клеток значительно слабее, чем СРС исходного штамма M49-16wt. Сопоставление изученных эффектов говорит в пользу решающей роли АД в подавлении миграции эндотелиальных клеток, но вместе с тем свидетельствует о наличии в составе СРС дополнительных факторов, которые вносят свой вклад в ингибирующее действие СРС на миграционную активность. О наличии таких факторов говорит и то, что добавление экзогенного аргинина в культуру, содержащую СРС, не приводило к ожидавшемуся усилению миграционной активности клеток. В отличие от этого, при культивировании клеток в присутствии АД добавление аргинина приводило к восстановлению их миграционной активности. Это доказывает, что миграция клеток в условиях эксперимента зависела от концентрации аргинина в среде. Различие действия АД и СРС в присутствии экзогенного аргинина могло быть обусловлено тем, что очищенный фермент приводил к накоплению в среде конечных продуктов метаболизма аргинина аммиака и цитруллина, а в составе СРС могли содержаться еще два фермента системы АД, катализирующих образование орнитина из цитруллина и продукцию АТФ.

Полученные нами результаты согласуются с данными литературы, свидетельствующими о цитопатическом действии АД в отношении разных типов клеток организма хозяина, в том числе эндотелиальных [15]. Для АД выделенной из *Mycoplasma sp.* на культуре эндотелиальных клеток вены пупочного канатика человека (HUVEC – human umbilical vein endothelial cells), было показано, что фермент подавляет рост эндотелиальных клеток, их миграцию в модели «раны» и формирование капилляроподобных структур на матригеле *in vitro* [4]. Эти данные были подтверждены в работе Park et al., в ходе которой было выявлено дозозависимое подавление АД формирования капилляроподобных структур *in vitro*, а также подавление ангиогенеза *in vivo* в модели хориоаллантоисной мембраны и в мышиной модели с матригелем [15]. В исследованиях Wei Zhuo [22] было показано, что подавление направленной миграции HMECs (human microvascular endothelial cells) АД обусловлено нарушением формирования актиновых филаментов в эндотелиальных tip-cells [22].

В нашем исследовании СРС, полученные из *S. pyogenes* всех использованных штаммов, вызывали значительные изменения морфологии клеток и структуры актинового цитоскелета. Эти изменения были связаны как со снижением количества фибриллярного актина, так и с потерей способности формировать ламеллиподии – структуры, обеспечивающие направленную миграцию клеток. Наиболее сильные изменения наблюдались при культивировании клеток в присутствии АД. В этом случае в клетках практически полностью разрушался фибрилярный актин, значительно уменьшалось их распластывание по субстрату и размер.

Созвучные результаты были получены другими исследователями при изучении влияния

дефицита аргинина на клетки глиобластомы человека [16]. В этой модели культивирование клеток в среде без аргинина приводило к значительному снижению их подвижности, адгезивности и инвазивности. В условиях дефицита аргинина клетки приобретали вытянутую форму, ламеллиподии движущего края не были такими широкими, как ламеллиподии клеток в контроле. При окрашивании актиновых филаментов выявлялось сниженное количество стресс-фибрилл и кортикального актина в сравнении с контролем. Описанные эффекты носили обратимый характер, так как добавление аргинина в среду для культивирования приводило к быстрому восстановлению морфологии и структуры цитоскелета уже через 3 часа. Авторы доказывают, что обнаруженные эффекты были обусловлены специфическими нарушениями организации актинового цитоскелета, вызванными дефицитом аргинилирования бета-актина [16].

В нашем исследовании добавление экзогенного аргинина в культуральную среду с супернатантами приводило только к частичному восстановлению морфологии клеток и структуры ламеллы, а заметное восстановление размера и формы клеток происходило только в случае культивирования их с АД. Этот факт можно объяснить тем, что в наших исследованиях дефицит аргинина был вызван действием фермента, который постоянно гидролизует добавляемый субстрат, что приводит к его непрерывному истощению в среде.

Полученные в наших исследованиях результаты подтверждают исследования Wei et al., в которых на клетках эндотелия микрососудов человека было показано, что АД *Mycoplasma sp*. в концентрации 10 мкг/мл вызывала нарушение индуцированной под влиянием VEGF-A направленной миграции клеток из-за изменения структуры актиновых филаментов в эндотелиальных tip-cells. Эти процессы были связаны с модуляцией активности eNOS, индукцией синтеза прооксидантов в клетках и следующего за этим каспаза-8-зависимого апоптоза [22]. Выявленные в нашей работе изменения структуры актиновых филаментов и подавление миграции клеток не были связаны с их гибелью, т.к. исходно подбирали концентрацию АД (3 мкг/мл), которая не оказывала ни проапоптотического, ни цитотоксического действия [1].

Полученные в данном исследовании результаты доказывают, что одним из механизмов подавления миграционной активности эндотелиальных клеток стрептококковой АД является нарушение структуры цитоскелета, вызванное дефицитом аргинина. Такое действие АД может служить причиной эндотелиальной дисфункции при стрептококковой инфекции с нарушением поступления биологически активных веществ и миграции лейкоцитов в очаг воспаления. Принимая во внимание, что актиновый цитоскелет обеспечивает не только миграцию, но и другие клеточные функции (адгезию, пролиферацию, фагоцитоз, дегрануляцию), действие бактериальной АД может приводить к нарушению различных функций всех типов клеток, в том числе участвующих в защитных реакциях при бактериальной инфекции. Эти вопросы требуют дальнейшего изучения.

Список литературы / References

1. Старикова Э.А., Лебедева А.М., Бурова Л.А., Фрейдлин И.С. Изменение функциональной активности эндотелиальных клеток под влиянием лизата *S. pyogenes* // Цитология, 2012. Т. 54, № 1. С. 49-57. [Starikova E.A., Lebedeva A.M., Burova L.A., Freidlin I.S. Regulation of endothelial cells functions by ultrasonic supernatant of *Streptococcus pyogenes*. *Tsitologiya = Cytology, 2012, Vol. 54, no. 1, pp. 49-57*. (In Russ.)]

2. Старикова Э.А., Карасева А.Б., Бурова Л.А., Суворов А.Н., Соколов А.В., Васильев В.Б., Фрейдлин И.С. Роль аргининдеиминазы *Streptococcus pyogenes* M49-16 в ингибиции пролиферации эндотелиальных клеток человека линии EA.hy926 // Медицинская иммунология, 2016. Т. 18, № 6. С. 555-562. [Starikova E.A., Karaseva A.B., Burova L.A., Suvorov A.N., Sokolov A.V., Vasilyev V.B., Freidlin I.S. Role of *Streptococcus pyogenes* M49-16 arginine deiminase in inhibition proliferation of human endothelial cell line EA.hy926. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2016, Vol. 18, no. 6, pp. 555-562.* (In Russ.)] doi: 10.15789/1563-0625-2016-6-555-562.

3. Тотолян А.А. Современные представления о *Streptococcus pyogenes* и вызываемой им патологии // Эволюция стрептококковой инфекции. Под ред. В.В. Левановича и В.Н. Тимченко. СПб.: Спецлит, 2015. С. 32-48. [Totolyan A.A. Cotemporary ideas about *Streptococcus pyogenes* and associated pathology. Evolution of streptococcal infection. Ed. by V.V. Levanovich, V.N. Timchenko]. St. Petersburg: Spetslit, 2015, pp. 32-48.

4. Beloussow K., Wang L., Wu J., Ann D., Shen W.C. Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent. *Cancer. Lett., 2002, Vol. 183, no. 2, pp. 155-162.*

5. Chen F., Lucas R., Fulton D. The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction. *Front. Immunol., 2013, Vol. 4, p. 184.*

6. Cohen S.S. A guide to the polyamines. New York.: Oxford University Press, 1998. 565 p.

7. Cunningham M.W. Pathogenesis of Group A Streptococcal Infections. *Clin. Microbial. Rev., 2000, Vol. 13, no. 3, pp. 470-511.*

8. Cusumano Z.T., Caparon M. Citrulline Protects Streptococcus pyogenes from Acid Stress Using the Arginine Deiminase Pathway and the F1Fo-ATPase. *J. Bacteriol., 2015, Vol. 197, no. 7, pp. 1288-1296.*

9. Gallego P., Planell R, Benach J, Querol E, Perez-Pons JA, Reverter D. Structural Characterization of the Enzymes Composing the Arginine Deiminase Pathway in Mycoplasma penetrans. *PLoS One, 2012, Vol. 7, no. 10, p. 86.*

10. Karakozova M., Kozak M., Wong C.C., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Mogilner A., Zebroski H., Kashina A. Arginylation of beta-actin regulates actin cytoskeleton and cell motility. *Science, 2006, Vol. 313, pp. 192-196.*

11. Kurosaka S., Leu A.N., Zhang F., Bunte R., Saha S., Wang L., Guo C., He W., Kashina A. Arginylation-Dependent Neural Crest Cell Migration Is Essential for Mouse Development. *PLoS Genet., 2010, Vol. 6, no. 3, pp. 45-50.*

12. Moncada S., Palmer R.M.J., Higgs E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol. Rev., 1991, Vol. 43, pp. 109-142.*
13. Morrison R.F., Seidel E.R. Vascular endothelial cell proliferation: regulation of cellular polyamines. *Cardiovasc Res., 1995, Vol. 29, pp. 841-847.*
14. Noris M., Ruggenenti P., Todeschini M., Figliuzzi M., Macconi D., Zoja C., Paris S., Gaspari F., Remuzzi G. Increased nitric oxide formation in recurrent thrombotic microangiopathies: a possible mediator of microvascular injury. *Am. J. Kidney Dis., 1996, Vol. 27, pp. 790-791.*
15. Park I.S., Kang S.W., Shin Y.J. , Chae K.Y., Park M.O., Kim M.Y., Wheatley D.N., Min B.H. Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth. *Br. J. Cancer, 2003, Vol. 89, pp. 907-914.*
16. Pavlyk I., Rzhepetskyy Y., Jagielski A.K., Drozak J., Wasik A., Pereverzieva G., Olchowik M., Kunz-Schugart L.A., Stasyk O., Redowicz M.J. Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of β actin arginylation. *Amino Acids, 2015, Vol. 47, pp. 199-212.*
17. Rhoads J.M., Chen W., Gookin J., Wu G.Y., Fu Q., Blikslager A.T., Rippe R.A., Argenzio R.A., Cance W.G., Weaver E.M., Romer L.H. Arginine stimulates intestinal cell migration through a focal adhesion kinase dependent mechanism. *Gut, 2004, Vol. 53, no. 4, pp. 514-522.*
18. Rhoads J.M., Liu Y., Niu X., Surendran S., Wu G. Arginine stimulates cdx2-transformed intestinal epithelial cell migration via a mechanism requiring both nitric oxide and phosphorylation of p70 S6 kinase. *J. Nutr., 2008, Vol. 138, no. 9, pp 1652-1657.*
19. Saha S., Mundia M.M., Zhang F., Demers R.W., Korobova F., Svitkina T., Perieteanu A.A., Dawson J.F., Kashina A. Arginylation regulates intracellular actin polymer level by modulating actin properties and binding of capping and severing proteins. *Mol. Biol. Cell., 2010, Vol. 21, pp. 1350-1361.*
20. Starikova E., Sokolov A., Vlasenko A., Burova L., Freidlin I., Vasilyev V. Biochemical anbiological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22. *Biochem. Cell Biol., 2016, Vol. 94, pp. 1-9.*
21. Takaku H., Takase M., Abe S., Hayashi H., Miyazaki K. *In vivo* antitumour activity of arginine deiminase purified from *Mycoplasma arginine*. *Int. J. Cancer., 1992, Vol. 51, pp. 244-249.*
22. Wei Zh., Xiaomin S., Zhou H., Luo Y. Arginine deiminase modulates endothelial tip cells via excessive synthesis of reactive oxygen species. *Biochem. Soc. Trans., 2011, Vol. 39, no. 5, pp. 143-147.*
23. Wong C.C., Xu T., Rai R., Bailey A.O., Yates J.R. 3rd, Wolf Y.I., Zebroski H., Kashina A. Global analysis of posttranslational protein arginylation. *PLoS Biol., 2007, Vol. 5, p. 258.*
24. Zúñiga M., Pérez G., González-Candelas G.F. Evolution of arginine deiminase (ADI) pathway genes. *Mol. Phylogenet. Evol., 2002, no. 25, pp. 429-444.*

Авторы:

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

Маммедова Дж.Т. *— аспирант ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный технологический институт (технический университет)», Санкт-Петербург, Россия*

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

Соколов А.В. *— к.б.н., заведующий лабораторией, отдел молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

Васильев В.Б. *— д.м.н., заведующий отделом молекулярной генетики ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет», Санкт-Петербург, Россия*

Фрейдлин И.С. *— д.м.н., член.-корр. РАН, главный научный сотрудник, отдел иммунологии ФГБНУ «Институт экспериментальной медицины»; ФГБОУ ВО «Санкт-Петербургский государственный университет»; ФГБОУ ВО «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. акад. И.П. Павлова», Санкт-Петербург, Россия*

Authors:

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

Mammedova J.T.*, Research Fellow, St. Petersburg State Technological University, St. Petersburg, Russian Federation*

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

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

Vasilyev V.B.*, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Molecular Genetics, Institute of Experimental Medicine; St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russian Federation*

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

Поступила 05.03.2017
Принята к печати 14.03.2017

Received 05.03.2017
Accepted 14.03.2017

РОЛЬ ИНТЕРЛЕЙКИНА-8 В НЕПОСРЕДСТВЕННОЙ РЕГУЛЯЦИИ ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ АКТИВНОСТИ Т-ЛИМФОЦИТОВ

Меняйло М.Е.[1], Малащенко В.В.[1], Шмаров В.А.[1], Газатова Н.Д.[1], Мелащенко О.Б.[1], Гончаров А.Г.[1], Селедцова Г.В.[2], Селедцов В.И.[3]

[1] ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия
[2] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия
[3] ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. CD3$^+$Т-лимфоциты выделяли из мононуклеарных клеток нормальных доноров методом позитивной магнитной сепарации. Показано, что продукция интерлейкина-8 (interleukin-8, IL-8) Т-клетками возрастала в ответ на их активацию частицами, конъюгированными с антителами к молекулам CD3, CD28 и CD2. Исходно рецептор к IL-8 (CXCR1, CD181) экспрессировался на 13,3% Т-лимфоцитов. Активация Т-лимфоцитов приводила к заметному увеличению содержания CD181$^+$ клеток среди CD4$^+$ наивных Т-лимфоцитов, CD4$^+$ терминально-дифференцированных Т-эффекторов и снижению их числа среди CD4$^+$ клеток эффекторной памяти. Активацию Т-лимфоцитов оценивали по экспрессии молекулы CD25 (рецептор к IL-2). Установлено, что IL-8 в диапазоне концентраций 0,01-10,0 нг/мл способен снижать активацию как CD4$^-$, так и CD4$^+$Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов, не оказывая при этом существенного влияния на активацию наивных Т-лимфоцитов и Т-клеток центральной памяти. IL-8 усиливал продукцию активированными Т-клетками IL-2, снижал продукцию IL-10 и существенно не влиял на секрецию IFNγ и IL-4. Полученные данные указывают на значимость IL-8 в прямой регуляции адаптивных Т-клеточных реакций.

Ключевые слова: интерлейкин-8, Т-лимфоциты, рецептор к интерлейкину-8, активация лимфоцитов, цитокины, функциональная активность

A ROLE FOR INTERLEUKIN 8 IN DIRECT REGULATION OF T CELL FUNCTIONAL ACTIVITY

Meniailo M.E.[a], Malashchenko V.V.[a], Shmarov V.A.[a], Gasatova N.D.[a], Melashchenko O.B.[a], Goncharov A.G.[a], Seledtsova G.V.[b], Seledtsov V.I.[c]

[a] I.Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation
[b] Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation
[c] Russian Research Center of Medical Rehabilitation and Balneotherapy, Moscow, Russian Federation

Abstract. CD3$^+$T lymphocytes were isolated from normal donors by positive magnetic separation. Activation of the T cells with particles conjugated with antibodies to CD3, CD28 and CD2 molecules led to substantial

Адрес для переписки:
Меняйло Максим Евгеньевич
ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта»
236016, Россия, г. Калининград, ул. Боткина, 3, комн. 302.
Тел.: 8 (916) 779-41-77, (911) 471-87-04.
E-mail: max89me@yandex.ru

Address for correspondence:
Meniailo Maksim E.
I. Kant Baltic Federal University
236016, Russian Federation, Kaliningrad, Botkin str., 3-302.
Phone: 7 (916) 779-41-77, (911) 471-87-04.
E-mail: max89me@yandex.ru

Образец цитирования:
М.Е. Меняйло, В.В. Малащенко, В.А. Шмаров, Н.Д. Газатова, О.Б. Мелащенко, А.Г. Гончаров, Г.В. Селедцова, В.И. Селедцов «Роль интерлейкина-8 в непосредственной регуляции функциональной активности Т-лимфоцитов» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 529-536. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-529-536

© Меняйло М.Е. и соавт., 2017

For citation:
M.E. Meniailo, V.V. Malashchenko, V.A. Shmarov, N.D. Gasatova, O.B. Melashchenko, A.G. Goncharov, G.V. Seledtsova, V.I. Seledtsov "A role for interleukin-8 in direct regulation of T cell functional activity", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 529-536. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-529-536

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-529-536

increase in T cell production of interleukin-8 (IL-8). An interleukin-8 receptor (CXCR1, CD181) was initially expressed in 13.3% of T lymphocytes. Activation of T lymphocytes resulted into a detectable increase of $CD181^+$ cell number among $CD4^+$ naïve cells and $CD4^+$ terminally-differentiated effector cells, and, conversely, into decrease of their number among $CD4^+$ effector memory cells. Activation of T lymphocytes was assessed by membrane expression of CD25 molecule (receptor for IL-2). IL-8 (0.01-10.0 ng/ml) was shown to markedly reduce activation of both $CD4^-$ and $CD4^+$ effector memory T cells, as well as terminally-differentiated T effectors, without significantly affecting activation of naive T lymphocytes and central memory T cells. IL-8 noticeably increased IL-2 production by activated T cells, caused a reduced IL-10 production, and did not significantly affect the secretion of IFNγ and IL-4. The data obtained suggest a significance of IL-8 for direct regulation of adaptive T cell responses.

Keywords: interleukin-8, T lymphocytes, interleukin 8 receptor, activation of lymphocytes, cytokines, functional activity

Введение

Интерлейкин-8 (interleukin-8, IL-8, CXCL8) относится к группе CXC хемокинов, состоит из 72 аминокислот, имеет молекулярную массу 8-10 кДа [6]. Продуцентами IL-8 являются моноциты/макрофаги, фибробласты, лимфоциты, клетки эндотелия и гладкой мускулатуры [5, 16]. IL-8 распознается рецепторами CXCR1 и CXCR2, которые экспрессируются на нейтрофилах, моноцитах/макрофагах и Т-лимфоцитах [4, 7, 11]. Данные рецепторы различаются по степени экспрессии и афинностью к IL-8, CXCR1 (CD181) связывает только IL-8, тогда как CXCR2 может также распознавать некоторые другие α-хемокины [21, 24]. После взаимодействия рецептора с IL-8 происходит связывание CXCR1 с G-белком, которое приводит к фосфоинозитидному гидролизу, а затем к внутриклеточной мобилизации Ca^{2+}, хемотаксису и экзоцитозу. CXCR1 также активирует фосфолипазу С и запускает кислородный взрыв [23]. IL-8 индуцирует хемотаксис гранулоцитов, моноцитов/макрофагов и лимфоцитов в очаг воспаления. Он способен активировать нейтрофилы, стимулируя их дегрануляцию. IL-8 также обладает способностью усиливать выработку провоспалительных цитокинов мононуклеарными клеткам [10, 19, 27]. В современной литературе довольно детально описана роль IL-8 в естественной иммунной защите. Вместе с тем роль IL-8 в механизмах адаптивного иммуногенеза пока остается малоизученной.

Цель настоящей работы – исследовать прямое влияние IL-8 на экспрессию его рецепторов на Т-лимфоцитах, а также прямые эффекты этого хемокина на активацию Т-клеток и продукцию ими иммунорегуляторных цитокинов.

Материалы и методы

В исследование были включены 14 условно здоровых доноров обоего пола в возрасте от 21 до 35 лет. Материалом для исследования служила гепаринизированная венозная кровь (20 мл), взятая стандартным методом из локтевой вены (BD Vacutainer™, Greiner-bio-one, Австрия).

Выделение мононуклеарных клеток (МНК) проводили посредством центрифугирования на фиколльном градиенте (Ficoll-Paque™ Premium sterile solution, плотность 1,077±0,001 g/ml, GE Healthcare, США). Подсчет клеточности проводили на счетчике клеток Z2 (Beckman Coulter, США). Т-лимфоциты ($CD3^+$) выделяли методом позитивной магнитной колоночной сепарации (MS Columns, Miltenyi Biotec, Германия) с использованием магнитных частиц, конъюгированных с анти-CD3-антителами (CD3 Micro Beads human, Miltenyi Biotec, Германия), согласно инструкции производителя.

Выделенные Т-клетки культивировали в концентрации 1,0-1,5 × 10^6 кл/мл, в бессывороточной среде TexMACS (Miltenyi Biotec, Германия), в 24-луночном планшете, во влажной атмосфере с 5% CO_2, при 37 °С в течение 48 ч в присутствии частиц, конъюгированных с антителами к CD2,CD3 и CD28 (T-Cell Activation/Expansion Kit human, MACS Miltenyi Biotec, Германия) или без них контроле. Рекомбинантный IL-8 (Miltenyi Biotec, Германия) вносили в пробы в разных концентрациях (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл) одновременно с внесением частиц – активаторов Т-клеток.

Чистоту и жизнеспособность выделенных $CD3^+$ клеток оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США) с использованием анти-CD3-антител, конъюгированных с фикоэритрином (eBioscience, США) и раствором PI (пропидиум иодид) (eBioscience, США). Цитометрический анализ Т-лимфоцитов проводили с использованием набора меченых антител: анти-CD4-PerCP, анти-CD181-FITC (eBioscience, США), анти-CD197-PE, анти-CD45RA-APC (BD Pharmingen, США) и анти-CD25-FITC (BioLegend, США). Для повышения точности и учета неспецифического связывания антител при гейтировании использовали изотип-контроли и FMO-контроли. Результаты оценивали на проточном цитофлуориметре (Accuri C6, BD Biosciences, США).

Уровни IL-2, IL-4, IL-8, IL-10 и IFNγ в Т-клеточных супернатантах определяли иммуноферментным методом на автоматическом анализаторе ChemWell 2910 (Awareness Technology, Inc., США) с использованием соответствующих

коммерческих тест-систем (ЗАО «Вектор-Бест», Россия).

Статистическую обработку данных проводили с помощью программы IBM SPSS Statistics 20 (Statistical Package for the Social Sciences, США). В качестве средневыборочной характеристики использовали медиану (M), первый и третий квартили ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$). Для оценки статистической достоверности исследуемых данных использовали непараметрический критерий Вилкоксона для зависимых выборок, не подчиняющихся нормальному закону распределения. Различия между выборками считались значимыми при уровне $p < 0,05$.

Результаты

Содержание $CD3^+$Т-лимфоцитов среди клеток, выделенных из крови методом позитивной магнитной сепарации, было близко к 99,0 (98,6-99,5)%, клеточная жизнеспособность была не менее 95% (рис. 1A-C).

Первоначально мы нашли, что Т-лимфоциты являются продуцентами IL-8. Концентрация IL-8 в супернатантах, полученных от неактивированных клеток, составляла 141,7 (50,0-120,0) пг/мл. Активация Т-лимфоцитов приводила к статистически значимому увеличению содержания в культуральных супернатантах IL-8 до 303,3 (200,0-236,0) пг/мл.

Использованная нами стратегия гейтирования представлена на рисунке 1. Она позволяла идентифицировать CD4-позитивные и CD4-негативные Т-клетки, а среди них $CD45RA^+CD197^+$ (наивные клетки), $CD45RA^-CD197^+$ (клетки центральной памяти), $CD45RA^-CD197^-$ (клетки эффекторной памяти), а также $CD45RA^+CD197^-$ (терминально-дифференцированные эффекторные клетки) [1, 25]. Количество клеток, экспрессирующих рецептор к IL-8 (CD181), а также маркер активации CD25 оценивали в каждой идентифицированной субпопуляции.

Как показано в таблице 1, содержание $CD181^+$ клеток среди $CD3^+$Т-лимфоцитов составило 13,3 (10,5-15,5)%. Наибольшее число $CD181^+$ клеток определялось среди $CD4^+$Т-лимфоцитов эффекторной памяти и $CD4^-$ терминально-дифференцированных Т-эффекторов. Добавление активатора вызывало достоверное увеличение колчества $CD181^+$ клеток среди $CD4^+$Т-наивных и $CD4^+$ терминально-дифференцированных Т-эффекторов. С другой стороны, активация Т-клеток приводила к снижению содержания $CD181^+$ клеток среди $CD4^+$Т-лимфоцитов эффекторной памяти. Снижение $CD181^+$ также было отмечено среди активированных $CD4^-$Т-лимфоцитов.

Первоначально мы установили, что IL-8 не способен оказывать значимого влияния на содержание $CD181^+$ клеток среди неактивированных Т-лимфоцитов (данные не представлены). Вместе с тем IL-8, добавленный в культуру в концентрации 10 нг/мл заметно снижал содержание $CD181^+$ клеток среди подвергшихся активации $CD4^-$ наивных, $CD4^-$ эффекторных и $CD4^-$ терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов (табл. 1).

Молекула CD25 – α-субъединица рецептора IL-2, является общепринятым маркером лимфоидной активации, приводящей к IL-2-зависимой пролиферации лимфоцитов [9, 22].

Согласно полученным нами результатам, IL-8 не оказывал существенного влияния на экспрессию CD25 на неактивированных Т-клетках (данные не представлены). Вместе с тем в концентрации 10,0 нг/мл IL-8 снижал содержание $CD25^+$ клеток, как среди $CD4^+$, так и среди $CD4^-$Т-лимфоцитов. Показано, что IL-8 во всех исследуемых концентрациях (0,01; 0,1; 1,0; 10,0 нг/мл) примерно в 2 раза снижал содержание активированных ($CD25^+$) клеток среди $CD4^+$Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-лимфоцитов и при этом не оказывал значимого влияния на активацию $CD4^+$ наивных Т-лимфоцитов и $CD4^+$Т-клеток центральной памяти. Сходные результаты были получены при исследовании влияния IL-8 на активацию $CD4^-$Т-клеток (табл. 2).

Функциональную активность Т-лимфоцитов оценивали по продукции про- (IL-2, IFNγ) и антивоспалительных (IL-4, IL-10) цитокинов. Согласно данным, представленным в таблице 3, IL-8 усиливал продукцию IL-2 активированными Т-клетками. Однако только в концентрациях 0,01 и 10,0 нг/мл это усиление было статистически значимым. С другой стороны, IL-8 обладал способностью снижать продукцию IL-10. Статистически достоверное снижение этого цитокина имело место при концентрации IL-8 0,1 и 10,0 нг/мл. Кроме того, IL-8 демонстрировал тенденцию к снижению продукцию IL-4, которая, однако, во всех исследуемых концентрациях IL-8 была статистически недостоверной. Продукция IFNγ активированными Т-клетками под воздействием IL-8 не претерпевала существенных изменений.

Обсуждение

Согласно данным, представленным в настоящей работе, Т-лимфоциты способны продуцировать IL-8. Активация Т-лимфоцитов приводила к усилению продукции IL-8. Эти результаты согласуются с ранее опубликованными данными, демонстрирующими продукцию IL-8 активированными $CD4^+$Т-клетками [14, 26]. Эти результаты прямо указывают на вовлеченность IL-8 в аутокринную регуляцию функциональной активности Т-лимфоцитов. Очевидно, что значимость этой регуляции может возрастать на периферии, вне лимфоидных органов, в условиях

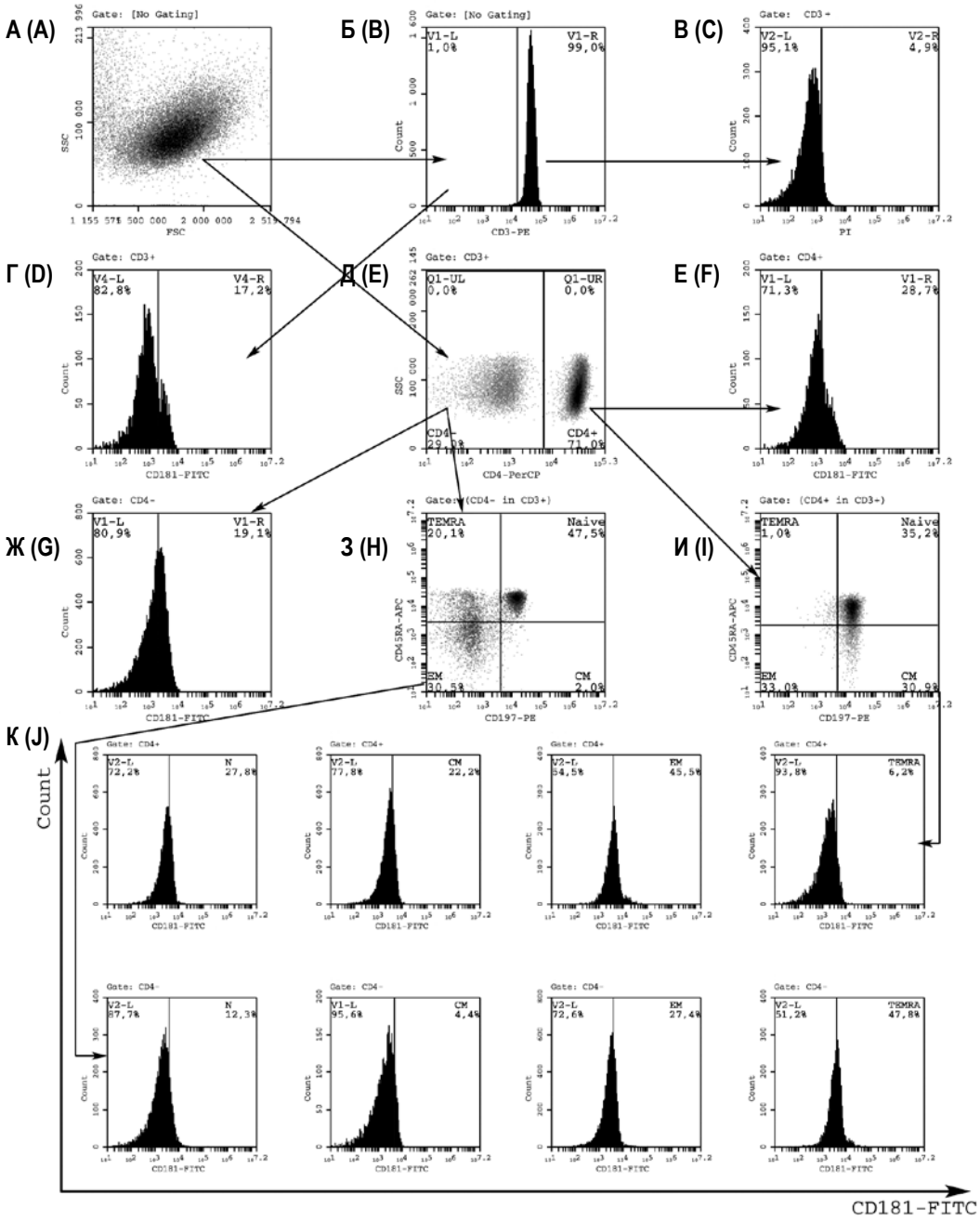

Рисунок 1. Алгоритм цитометрического анализа Т-лимфоцитов при определении CD181⁺ клеток

Примечание. А) распределение клеток по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию;
Б) содержание CD3⁺ клеток;
В) жизнеспособность клеток, оцениваемая по окрашиванию PI: зона позитива – мертвые, зона негатива – живые;
Г) содержание CD181⁺ лимфоцитов среди CD3⁺ клеток;
Д) идентификация CD4-позитивных и CD4-негативных клеток. Зона позитива и зона негатива соответственно;
Е) содержание CD181⁺ лимфоцитов среди CD4⁺ клеток;
Ж) содержание CD181⁺ лимфоцитов среди CD4⁻ клеток;
З) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов среди CD4⁻ клеток;
И) идентификация наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов клеток среди CD4⁺ клеток;
К) содержание CD181⁺ лимфоцитов среди наивных Т-клеток, Т-лимфоцитов центральной памяти, Т-клеток эффекторной памяти и терминально-дифференцированных Т-эффекторов в CD4⁺ и CD4⁻ Т-субпопуляциях.

Figure 1. Algorithm for cytometric detection of CD181⁺ cells among the T lymphocyte population.
A) cell distribution by forward and side light scatter (resp., FSC and SSC);
B) CD3⁺ cell contents;
C) cell viability evaluated by PI staining: positive area, dead cells; negative area, live cells;
D) CD181⁺ lymphocyte contents among CD3⁺ cells;
E) CD4⁺ versus CD4⁻ cell identification (positive and negative areas, respectively);
F) CD181⁺ contents among CD4⁺ cells;
G) CD181⁺ lymphocyte contents among CD4- cells;
H) identification of naïve T cells, central memory T lymphocytes, effector memory T cells, and terminally differentiated T effectors among CD4⁻ cells;
I) identification of naïve T cells, central memory T lymphocytes, effector memory T cells, and terminally differentiated T effectors among CD4⁺ cells;
J) contents of CD181⁺ lymphocytes among naïve T cells, central memory T lymphocytes, effector memory T cells, and terminally differentiated T effectors in CD4⁺ and CD4⁻ T subpopulations.

ТАБЛИЦА 1. CD181$^+$ (%) КЛЕТКИ СРЕДИ CD4$^+$ И CD4$^-$Т-ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 1. CD181$^+$ (%) CELLS AMONG CD4$^+$ AND CD4$^-$T LYMPHOCYTES

Субпопуляция Subpopulation	**Без активации** Without activation	**Активация** Activation	**Активация + IL-8 (10,0 нг/мл)** Activation + IL-8 (10.0 ng/ml)
CD4$^+$	10,5 (7,2-14,6)	15,5* (13,2-16,6)	16,5 (15,4-17,5)
CD4$^+$ наивные клетки CD4$^+$ naïve cells	26,5 (25,4-29,0)	37,0* (33,8-38,7)	37,5 (33,7-41,2)
CD4$^+$ клетки центральной памяти CD4$^+$ central memory cells	22,2 (21,7-29,4)	23,8 (18,6-28,2)	20,2 (14,5-25,1)
CD4$^+$ клетки эффекторной памяти CD4$^+$ effector memory cells	44,5 (39,1-45,3)	29,9* (26,8-32,7)	33,9 (29,5-34,2)
CD4$^+$ терминально-дифференцированные эффекторы CD4$^+$ terminally differentiation effector cells	5,6 (3,6-7,1)	10,4* (6,9-13,9)	7,9 (7,2-15,0)
CD4$^-$	15,5 (14,9-21,1)	25,7* (14,9-26,6)	21,0 (15,9-22,8)
CD4$^-$ наивные клетки CD4$^-$ naïve cells	14,2 (12,0-20,8)	15,5 (9,7-18,2)	8,9** (8,2-9,9)
CD4$^-$ клетки центральной памяти CD4$^+$ central memory cell	1,8 (1,4-1,9)	1,4 (1,0-3,3)	2,7 (1,7-3,1)
CD4$^-$ клетки эффекторной памяти CD4$^+$ effector memory cells	28,3 (26,4-29,7)	28,4 (19,8-28,9)	22,0** (16,5-26,6)
CD4$^-$ терминально-дифференцированные эффекторы CD4$^+$ terminally differentiation effector cells	54,4 (51,0-57,7)	60,2 (52,0-64,4)	45,1** (40,7-52,4)

Примечание. * p < 0,05 – в сравнении с пробами без активатора; ** p < 0,05 – в сравнении с пробами с активатором. Здесь и далее данные представлены в виде медианы, в скобках первый и третий квартили.

Note. * p < 0.05, compared with samples without activation; ** p < 0.05, compared with samples with activation. Here and further data was presented as median, and first, and third quartiles.

дефицита вспомогательных и иммунорегуляторных клеток.

Согласно представленным данным, содержание клеток, экспрессирующих рецептор к IL-8 составляет 13,3 (10,5-15,5)%. В целом эти результаты согласуются с литературными данными [8]. Интересно, что наибольшее содержание CD181$^+$ клеток было отмечено среди покоящихся CD4$^+$Т-клеток эффекторной памяти и среди CD4$^-$ терминально-дифференцированных Т-эффекторов, которые характеризуются высокой степенью зрелости. Эти клетки не обладают миграционной тропностью к лимфоидным органами, по-видимому, не вносят существенный вклад в генерацию долговременной иммунной памяти. Следует, однако, иметь в виду, что активация Т-лимфоцитов может индуцировать экспрессию CD181 на относительно низкодифференцированных Т-лимфоцитах, способных мигрировать в лимфоидные органы и там подвергаться клональной экспансии [12]. Отсюда можно предполагать участие IL-8 в механизмах, регулирующих формирование долговременной иммунной памяти. Это предположение согласуется с ранее опубликованными данными, показавшими, что IL-8 способен индуцировать экспрессию CD181 на активированных CD8$^+$Т-лимфоцитах центральной памяти [13]. В нашей работе мы показали разнонаправленное влияние IL-8 на экспрессию CD181, выявляемую на разных Т-клеточных субпопуляциях. Возможно, это связано с интернализацией рецептора после его связывания с IL-8 [18, 20].

В настоящей работе мы показали способность IL-8 избирательно снижать оцениваемую по экспрессии CD25 активацию высокодиффе-

ТАБЛИЦА 2. СОДЕРЖАНИЕ $CD25^+$ (%) КЛЕТОК СРЕДИ $CD4^+$ И $CD4^-$Т-ЛИМФОЦИТОВ

TABLE 2. $CD25^+$ (%) CELLS CONTENT AMONG $CD4^+$ AND $CD4^-$T LYMPHOCYTES

Субпопуляция Subpopulation	**Без активации** Without activation	**Ативация + IL-8 (нг/мл)** Activation + IL-8 (ng/ml)				
		0,0	**0,01**	**0,1**	**1,0**	**10,0**
$CD4^+$	0,1 (0-0,2)	6,0* (2,6-14,4)	6,5 (1,8-13,3)	6,0 (2,0-14,1)	7,1 (1,5-14,5)	4,6** (1,8-12,6)
$CD4^+$ наивные клетки $CD4^+$ naïve cells	0,0 (0,0-0,1)	3,3* (1,4-5,1)	4,3 (1,3-5,7)	3,5 (1,8-8,0)	3,8 (1,9-8,9)	3,5 (1,1-6,8)
$CD4^+$ клетки центральной памяти $CD4^+$ central memory cells	0,05 (0-0,2)	9,2* (5,4-11,5)	10,3 (4,7-18,7)	9,9 (6,1-17,4)	11,3 (8,3-20,4)	10,1 (4,2-15,5)
$CD4^+$ клетки эффекторной памяти $CD4^+$ effector memory cells	0,35 (0,1-0,9)	21,9* (6,9-44,4)	10,7** (4,9-38,4)	11,7** (5,3-42,1)	11,7** (4,2-42,2)	9,5** (6,3-41,0)
$CD4^+$ терминально-дифференцированные эффекторы $CD4^+$ terminally differentiation effector cells	0,0 (0,0-0,9)	27,1* (6,1-55,9)	12,9** (2,7-51,0)	11,4** (4,4-50,2)	9,7** (1,9-45,7)	12,7** (5,4-48,8)
$CD4^-$	0,2 (0,1-0,4)	19,3* (1,5-30,6)	20,5 (5,8-27,2)	22,0 (4,4-27,4)	21,1 (6,2-28,8)	18,1** (4,5-25,7)
$CD4^-$ наивные клетки $CD4^-$ naïve cells	0,0 (0,0-0,1)	13,9* (5,6-15,3)	13,4 (11,7-16,2)	14,8 (11,0-16,2)	14,6 (14,1-16,7)	11,4 (11,2-11,8)
$CD4^-$ клетки центральной памяти $CD4^-$ central memory cells	0,0 (0,0-0,1)	29,7* (11,5-36,4)	28,9 (4,3-39,8)	26,6 (2,9-40,1)	25,2 (7,5-41,0)	24,1 (3,2-40,0)
$CD4^-$ клетки эффекторной памяти $CD4^-$ effector memory cells	0,45 (0,2-0,7)	29,8* (8,2-53,9)	8,2** (6,5-52,2)	10,4** (6,1-56,4)	9,5** (6,4-53,7)	14,3** (5,8-52,9)
$CD4^-$ терминально-дифференцированные эффекторы $CD4^-$ terminally differentiation effector cells	0,4 (0,1-0,7)	17,7* (9,4-28,4)	16,0 (6,6-29,6)	14,9** (6,6-29,6)	13,7** (4,2-30,7)	13,7** (9,1-27,6)

Примечание. См. примечание к таблице 1.
Note. See note to table 1.

ренцированных $CD197^-$Т-клеток, утративших способность мигрировать в лимфоидные органы и подвергаться там размножению. Эти данные указывают на возможную прямую вовлеченность IL-8 в негативную регуляцию локальных Т-клеточных реакций [2]. На такую вовлеченность могут также указывать ранее опубликованные данные о способности регуляторных $CD4^+FoxP3^+$Т-клеток вырабатывать IL-8 [17], которая резко возрастает в ответ на их активацию [3]. В свете представленных данных можно предполагать, что IL-8, наряду с IL-10 и TGF-β, способен опосредовать иммуносупрессивный эффект регуляторных Т-клеток. Однако, это предположение входит в прямое противоречие с нашими данными, демонстрирующими позитивный эффект IL-8 на Т-клеточную продукцию IL-2 и негативный эффект на секрецию IL-10. Мы также заметили, что IL-8 свойственна тенденция снижать осуществляемую активированными Т-клетками продукцию IL-4. Такая тенденция была также описана ранее [15]. Таким образом, IL-8 способен оказывать разнонаправленное влияние на активацию и функциональную деятельность разных Т-клеточных субпопуляций. Мы предполагаем, что, с одной стороны, IL-8 мог бы препятствовать развитию избыточных Т-клеточных реакций на периферии, с другой – он мог бы способствовать развитию адаптивных Т-клеточных процессов, формирующих иммунную память.

ТАБЛИЦА 3. ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ Т-ЛИМФОЦИТАМИ (пг/мл)

TABLE 3. PRODUCTION OF CYTOKINES BY T LYMPHOCYTES (pg/ml)

Цитокин Cytokine	**Без активации** Without activation	**Активация + IL-8 (нг/мл)** Activation + IL-8 (ng/ml)				
		0,0	**0,01**	**0,1**	**1,0**	**10,0**
IL-2	< 10	500* (158-1215)	702** (253-1314)	620 (236-1245)	662 (233-1331)	619** (218-1488)
IFNγ	< 10	3402,7* (1775-4479)	2992,5 (1134-5556)	1620 (1061-7620)	3781 (1187-7203)	4430 (694-7057)
IL-4	< 2	13,9* (3,4-41,8)	6,9 (3,6-15,0)	8,4 (4,8-12,9)	9,0 (3,3-33,3)	9,3 (5,1-17,2)
IL-10	< 5	439,8* (194,4-728,8)	504,8 (219,4-612,6)	385,65** (233,6-607,8)	458,25 (233,7-657,0)	285,9** (185,4-683,5)

Примечание. См. примечание к таблице 1.

Note. See note to table 1.

Список литературы / References

1. Кудрявцев И.В. Т-клетки памяти: основные популяции и стадии дифференцировки // Российский иммунологический журнал, 2014. Т. 8 (17), № 4. С. 947-964. [Kudryavtsev I.V. Memory T cells: major populations and stages of differentiation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2014, Vol. 8 (17), no. 4, pp. 947-964.* (In Russ.)]

2. Меняйло М.Е., Малащенко В.В., Шмаров В.А., Газатова Н.Д., Тодосенко Н.М., Мелащенко О.Б., Гончаров А.Г., Селедцов, В.И. Прямое влияние интерлейкина-8 на активацию Т-клеток // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10, № 2. С. 174-178. [Meniailo M.E., Malashchenko V.V., Shmarov V.A., Gazatova N.D., Todosenko N.M., Melashchenko O.B., Goncharov A.G., Seledsov V.I. The direct influence of interleukin-8 on T-cell activation. *Rossiyskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2016, Vol. 10, no. 2, pp. 174-178.* (In Russ.)]

3. Akhade A.S., Qadri A. T-cell receptor activation of human $CD4^+$ T cells shifts the innate TLR response from $CXCL8^{hi}IFN\gamma^{null}$ to $CXCL8^{lo}IFN\text{-}\gamma^{hi}$. *European Journal of Immunology, 2015, Vol. 45, no. 9, pp. 2628-2637.*

4. Becker S., Quay J., Koren H.S., Haskill J.S. Constitutive and stimulated MCP-1, GRO alpha, beta, and gamma expression in human airway epithelium and bronchoalveolar macrophages. *Am. J. Physiol., 1994, Vol. 266, no. 3, pp. L278-L286.*

5. Bickel M. The role of interleukin-8 in inflammation and mechanisms of regulation. *J. Periodontol., 1993, Vol. 64, no. 5, pp. 456-460.*

6. Brat D.J., Bellail A.C., van Meir E.G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neurooncol., 2005, Vol. 7, no. 2, pp. 122-133.*

7. Casilli F., Bianchini A., Gloaguen I., Biordi L., Alesse E, Festuccia C., Cavalieri B., Strippoli R., Cervellera M.N., Di Bitondo R., Ferretti E., Mainiero F., Bizzarri C., Colotta F., Bertini R. Inhibition of interleukin-8 (CXCL8/IL-8) responses by repertaxin, a new inhibitor of the chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Biochem. Pharmacol., 2005, Vol. 69, no. 3, pp. 385-394.*

8. Chuntharapai A., Lee J., Hebert C.A., Kim K.J. Monoclonal antibodies detect different distribution patterns of IL-8 receptor A and IL-8 receptor B on human peripheral blood leukocytes. *J. Immunol., 1994, Vol. 152, no. 12, pp. 5682-5688.*

9. Clausen J., Vergeiner B., Enk M., Petzer A.L., Gastl G., Gunsilius E. Functional significance of the activation-associated receptors CD25 and CD69 on human NK-cells and NK-like T-cells. *Immunobiology, 2003, Vol. 207, no. 2, pp. 85-93.*

10. de Oliveira S., Reyes-Aldasoro C.C., Candel S., Renshaw S.A., Mulero V., Calado A. Cxcl8 (IL-8) mediates neutrophil recruitment and behavior in the zebrafish inflammatory response. *J. Immunol., 2013, Vol. 190, no. 8, pp. 4349-4359.*

11. Dixit N., Simon S. I. Chemokines, selectins and intracellular calcium flux: temporal and spatial cues for leukocyte arrest. *Front. Immunol., 2012, Vol. 3, no. 188.*

12. Francis J.N., Jacobson M.R., Lloyd C.M., Sabroe I., Durham S.R., Till S.J. $CXCR1^+$ $CD4^+$ T cells in human allergic disease. *J. Immunol., 2004, Vol. 172, no. 1, pp. 268-273.*

13. Gasser O., Missiou A., Eken C., Hess C. Human $CD8^+$ T cells store CXCR1 in a distinct intracellular compartment and up-regulate it rapidly to the cell surface upon activation. *Blood, 2005, Vol. 106, no. 12, pp. 3718-3724.*

14. Gesser B., Deleuran B., Lund M., Vestergard C., Lohse N., Deleuran M., Jensen S.L., Pedersen S.S., Thestrup-Pedersen K., Larsen C.G. Interleukin-8 induces its own production in $CD4^+$ T lymphocytes: a process regulated by interleukin 10. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 1995, Vol. 210, no. 3, pp. 660-669.*

15. Gesser B., Lund M., Lohse N., Vestergaad C., Matsushima K., Sindet-Pedersen S., Larsen C.G. IL-8 induces T cell chemotaxis, suppresses IL-4, and up-regulates IL-8 production by $CD4^+$ T cells. *J. Leukoc. Biol., 1996, Vol. 59, no. 3, pp. 407-411.*

16. Hedges J.C., Singer C.A., Gerthoffer W.T. Mitogen-activated protein kinases regulate cytokine gene expression in human airway myocytes. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol., 2000, Vol. 23, no. 1, pp. 86-94.*
17. Himmel M.E., Crome S.Q., Ivison S., Piccirillo C., Steiner T.S., Levings M.K. Human $CD4^+$ $FOXP3^+$ regulatory T cells produce CXCL8 and recruit neutrophils. *European Journal of Immunology, 2011, Vol. 41, no. 2, pp. 306-312.*
18. Jones S.A., Wolf M., Qin S., Mackay C.R., Baggiolini, M. Different functions for the interleukin 8 receptors (IL-8R) of human neutrophil leukocytes: NADPH oxidase and phospholipase D are activated through IL-8R1 but not IL-8R2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1996, Vol. 93, no. 13, pp. 6682-6686.*
19. Kohidai L., Csaba G. Chemotaxis and chemotactic selection induced with cytokines (IL-8, Rantes and TNF-α) in the unicellular Tetrahymena pyriformis. *Cytokine, Vol. 10, no. 7, pp. 481-486.*
20. L'Heureux G.P., Bourgoin S., Jean N., McColl S.R., Naccache P.H. Diverging signal transduction pathways activated by interleukin-8 and related chemokines in human neutrophils: interleukin-8, but not NAP-2 or GRO alpha, stimulates phospholipase D activity. *Blood, 1995, Vol. 85, no. 2, pp. 522-532.*
21. Lippert U., Zachmann K., Henz B.M., Neumann C. Human T lymphocytes and mast cells differentially express and regulate extra-and intracellular CXCR1 and CXCR2. *Exp. Dermatol., 2004, Vol. 13, no. 8, pp. 520-525.*
22. Murphy K., Travers P., Walport M. Janeway's Immunobiology. New York: Garland Science, 2011. 888 p.
23. Nasser M.W., Raghuwanshi S.K., Grant D.J., Jala V.R., Rajarathnam K., Richardson R.M. Differential activation and regulation of CXCR1 and CXCR2 by CXCL8 monomer and dimer. *J. Immunol., 2009, Vol. 183, no. 5, pp. 3425-3432.*
24. Raghuwanshi S.K., Su Y., Singh V., Haynes K., Richmond A., Richardson R.M. The chemokine receptors CXCR1 and CXCR2 couple to distinct G protein-coupled receptor kinases to mediate and regulate leukocyte functions. *J. Immunol., 2012, Vol. 289, no. 6, pp. 2824-2832.*
25. Todosenko N.M., Shmarov V.A., Malashchenko V.V., Meniailo M.E., Melashchenko O.B., Gazatova N.D., Goncharov A.G., Seledtsov V.I. Erythropoietin exerts direct immunomodulatory effects on the cytokine production by activated human T-lymphocytes. *Int. Immunopharmacol, 2016, Vol. 36, pp. 277-281.*
26. Wechsler A.S., Gordon M.C., Dendorfer U., LeClair K.P. Induction of IL-8 expression in T cells uses the CD28 costimulatory pathway. *J. Immunol., 1994, Vol. 153, no. 6, pp. 2515-2523.*
27. Zheng M., Sun G., Cai S., Mrowietz U. T-lymphocyte chemotaxis to IL-8 in patients with psoriasis *in vitro. Chin. Med. J., 1998, Vol. 111, no. 2, pp. 166-168.*

Авторы:

Меняйло М.Е. *— младший научный сотрудник ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия*

Малащенко В.В. *— младший научный сотрудник ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия*

Шмаров В.А. *— младший научный сотрудник ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия*

Газатова Н.Д. *— научный сотрудник ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия*

Мелащенко О.Б. *— научный сотрудник ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия*

Гончаров А.Г. *— к.м.н., директор Центра медицинских биотехнологий ФГАОУ «Балтийский федеральный университет имени Иммануила Канта», г. Калининград, Россия*

Селедцова Г.В. *— д.м.н., заведующая лабораторией клеточных биотехнологий ФГБНУ «Научно-исследовательский институт фундаментальной и клинической иммунологии» СО РАМН, г. Новосибирск, Россия*

Селедцов В.И. *— д.м.н., профессор, заведующий отделом диагностических технологий ФГБУ «Российский научный центр медицинской реабилитации и курортологии» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Authors:

Meniailo M.E.*, Junior Research Associate, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

Malashchenko V.V.*, Junior Research Associate, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

Shmarov V.A.*, Junior Research Associate, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

Gasatova N.D.*, Research Associate, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

Melashchenko O.B.*, Research Associate, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

Goncharov A.G.*, PhD (Medicine), Director, Center of Medical Biotechnologies, I. Kant Baltic Federal University, Kaliningrad, Russian Federation*

Seledtsova G.V.*, PhD, MD (Medicine), Head, Laboratory of Cellular Biotechnology, Research Institute of Clinical Immunology, Siberian Branch, Russian Academy of Medical Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

Seledtsov V.I.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Diagnostic Technologies, Russian Research Center of Medical Rehabilitation and Balneotherapy, Moscow, Russian Federation*

Поступила 30.03.2017
Принята к печати 02.05.2017

Received 30.03.2017
Accepted 02.05.2017

СЕТЕВОЙ ПОДХОД К АНАЛИЗУ ЛОКУСОВ КОЛИЧЕСТВЕННЫХ ПРИЗНАКОВ ГЕНОВ ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ (*TNFα-863, TNFα-308, TNFα-238*), ФАКТОРА РОСТА СОСУДИСТОГО ЭНДОТЕЛИЯ (*VEGF-2578, VEGF+936*) И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ (*MMP2-1306, MMP3-1171, MMP9-1569*) ПРИ ВОЗРАСТНОЙ МАКУЛЯРНОЙ ДЕГЕНЕРАЦИИ

Шевченко А.В.[1], Прокофьев В.Ф.[1], Коненков В.И.[1], Черных В.В.[2], Еремина А.В.[2], Дудникова Л.В.[2], Кашкина Н.Ю.[2], Трунов А.Н.[2]

[1] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», г. Новосибирск, Россия
[2] ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия

Резюме. Возрастная макулярная дегенерация – одно из самых распространенных мультифакториальных заболеваний глаз. Особенности полиморфизма фактора роста эндотелия сосудов совместно с матриксными металлопротеиназами и фактором некроза опухолей α могут влиять на развитие заболевания. Проведен анализ распределения частот генотипов регуляторных регионов генов *VEGF* (rs 699947, rs 3025039), *MMP 2* (rs 2438650), *MMP3* (rs 3025058), *MMP 9* (rs 3918242), *TNFα* (rs1800630, rs1800629, rs 361525) и их комбинаций у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией. Частоты генотипов *TNFα* (rs1800629) значимо различались между пациентами с макулярной дегенерацией и контрольной группой. При анализе комплексных генотипов выявлены шесть позитивно ассоциированных с развитием болезни комплексов *VEGF-MMP* генов. В состав пяти из них входит минорный гомозиготный генотип *VEGF-2578AA*. Совместный анализ полиморфизма генов *VEGF – TNFα* показал наличие как позитивных, так и негативных комплексных генотипов. Максимально значимый уровень различий установлен при сравнительном анализе частоты комплексных генотипов, включающих в свой состав 8 полиморфных участков регуляторных областей всех исследуемых генов. В большинстве генетических комплексов, ассоциированных с развитием заболевания, выявлено наличие гомозиготных генотипов *TNFα-863CC,* гомозиготных вариантов *MMP2-1306 TT* и *MMP9-1562CC* в сочетании в генотипе этих же пациентов гомозиготного генотипа *VEGF+936CC*. Можно предположить, что для пациентов с макулярной дегенерацией характерно наличие в геноме аллельных вариантов, предрасполагающих к развитию ангиогенеза, наряду с низким уровнем продукции провоспалитель-

Адрес для переписки:
Шевченко Алла Владимировна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии»
630060, Россия, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 2.
Тел./факс: 8 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Address for correspondence:
Shevchenko Alla V.
Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology
630060, Russian Federation, Novosibirsk, Timakova str., 2.
Phone/Fax: 7 (952) 901-36-80.
E-mail: shalla64@mail.ru

Образец цитирования:
А.В. Шевченко, В.Ф. Прокофьев, Коненков В.И., В.В. Черных, А.В. Еремина, Л.В. Дудникова, Н.Ю. Кашкина, А.Н. Трунов «Сетевой подход к анализу локусов количественных признаков генов фактора некроза опухолей (TNFα-863, TNFα-308, TNFα-238), фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF-2578, VEGF+936) и матриксных металлопротеиназ (MMP2-1306, MMP3-1171, MMP9-1569) при возрастной макулярной дегенерации» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 537-546. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-537-546

© Шевченко А.В. и соавт., 2017

For citation:
A.V. Shevchenko, V.F. Prokofyev, V.I. Konenkov, V.V. Chernykh, A.V. Eremina, L.V. Dudnikova, N.Yu. Kashkina, A.N. Trunov “Network approach to analysis of quantitative trait loci for tumor necrosis factor (TNFα-863, TNFα-308, TNFα-238), vascular endothelial growth factor (VEGF-2578, VEGF+936) and matrix metalloproteinase (MMP2-1306, MMP3-1171, MMP9-1569) genes in age-related macular degeneration”, Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 537-546. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-537-546

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-537-546

ных регуляторных факторов и ферментов, участвующих в разрушении межклеточного матрикса. Использование комплексных генетических факторов, продукты которых принимают участие в патологическом процессе и одновременно являются регуляторами продукции в отношении друг друга, имеет большую информативность при выявлении протективных и резистентных маркеров развития заболевания, чем одиночные генетические маркеры и могут быть использованы при скрининговых исследованиях.

Ключевые слова: возрастная макулярная дегенерация, полиморфизм TNF, полиморфизм VEGF, полиморфизм MMP, сетевой анализ

NETWORK APPROACH TO ANALYSIS OF QUANTITATIVE TRAIT LOCI FOR TUMOR NECROSIS FACTOR (*TNFα-863, TNFα-308, TNFα-238*), VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (*VEGF-2578, VEGF+936*) AND MATRIX METALLOPROTEINASE (*MMP2-1306, MMP3-1171, MMP9-1569*) GENES IN AGE-RELATED MACULAR DEGENERATION

Shevchenko A.V.[a], Prokofyev V.F.[a], Konenkov V.I.[a], Chernykh V.V.[b], Eremina A.V.[b], Dudnikova L.V.[b], Kashkina N.Yu.[b], Trunov A.N.[b]

[a] *Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian Federation*
[b] *S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Eye Microsurgery Complex, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation*

Abstract. Age-related macular degeneration is one of the most widespread multifactorial eye diseases. Polymorphic functional alleles of vascular endothelial growth factor (VEGF) combined with matrix metalloproteinase (MMP) gene and tumor necrosis factor (TNF) gene variants may influence the development of disease. We have performed frequency analysis of their polymorphisms in regulatory regions of *VEGF* (rs 699947, rs 3025039), *MMP2* (rs 2438650), *MMP3* (rs 3025058), *MMP9* (rs 3918242), *TNFα* (rs1800630, rs1800629, rs 361525) genes, and their combinations in a group of patients with age-related macular degeneration (MD). Frequencies of *TNFα* (rs1800629) genotypes significantly differed for the MD patients and control group. Upon the combined genotype analysis, we have revealed six constellations of *VEGF-MMP* genes that were positively associated with the disease development. Five of them included minor homozygous genotype *VEGF-2578AA*. A combined analysis of *VEGF – TNFα* genes polymorphisms has shown presence of both positive and negative complex genotypes. The most significant differences have been detected by comparative analysis of the complex genotypes frequencies which included 8 polymorphic regulatory gene regions of all genes studied. In most genetic complexes associated with the disease development, homozygous *TNFα-863CC,* homozygous *MMP2-1306 TT,* and *MMP9-1562CC* genotypes have been detected, together with the combination of homozygous *VEGFA+936CC* genotype in the same patients. We can assume that harboring allelic variants, which may contribute to angiogenesis prorcesses is typical for the genome of patients with macular degeneration, along with low-level production of pro-inflammatory regulatory factors and enzymes participating in degradation of extracellular matrix. Analysis of complex genetic factors, procing some factors taking part at the pathological process being the regulators of production for each other, is more informative when detecting protective and resistant markers of the disease development rather than single genetic markers, thus being useful for genomic screening.

Keywords: age-related macular degeneration, polymorphism TNF, VEGF polymorphism, MMP polymorphism, network analysis

Введение

Возрастная макулярная дегенерация (ВМД) – одно из самых распространенных мультифакториальных заболеваний глаз, являющееся основной причиной необратимого ухудшения центрального зрения в пожилом возрасте [28]. Атрофическая (сухая) форма ВМД может переходить в более тяжелую экссудативную (влажную) форму, которая часто является причиной слепоты. Для этого типа ВМД характерно формирование хориоидальной неоваскулярной мембраны (ХНВМ), которая образована патологическими кровеносными сосудами, врастающими в слои сетчатки из сосудистой оболочки [8]. Факторы риска ВМД гетерогенны: ключевыми являются возраст, генетические факторы предрасположенности к заболеванию, целый ряд эпигенетических факторов [28]. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) – важный фактор ангиогенеза, а повышенные концентра-

ции VEGF при ВМД предполагают его участие в формировании заболевания. Показаны высокие уровни VEGF в стекловидном теле у пациентов с влажным типом ВМД. Причем уровень VEGF белка в ряде исследований ассоциирован с однонуклеотидными заменами (SNPs) в промоторном и 3` нетранслируемом регионах гена [8]. Индуцируя формирование сосудов, усиливая пролиферацию и миграцию эндотелиоцитов, VEGF находится в тесной взаимосвязи с синтезом металлопротеиназ (MMP) – ферментов, необходимых для инвазии новообразованных сосудов в окружающие ткани [10]. Показано, что поддержание нормального экстрацеллюлярного матрикса (коллагенов I и IV типов) между эпителием клетчатки и мембраной Бруха происходит за счет регулирования активности металлопротеиназ MMP2, MMP3, MMP9. Причем уровень секреции матриксных металлопротеиназ у пациентов с ВМД и у здоровых различается [18]. Кроме того, экспрессия VEGF может регулироваться и другими факторами, например фактором некроза опухоли α (TNFα) [9].

На сегодняшний день исследование генетических маркеров при развитии ВМД и особенностей их взаимодействий имеет большое значение [13]. Механизм этих взаиморегуляций не до конца понятен, но основными мишенями исследований многие видят именно регуляторные 5 UTR/3 UTR регионы генов. Однако, несмотря на активные исследования полиморфизма *VEGF* и единичные на сегодняшний день исследования полиморфизма *MMP* и *TNFα* с развитием и характером течения ВМД, данные остаются противоречивыми [7, 17, 24]. Основные трудности в интерпретации имеющихся данных могут быть связаны со сложившимися подходами к генетическому анализу как к качественному признаку, работающему по двоичному принципу «да/нет» для того или иного полиморфного локуса. Очевидно, что здесь более применимы принципы анализа, для которого характерно полигенное или мультифакторное наследование. Это относится к наследованию характеристик фенотипа, за которые отвечают два или более гена, или взаимодействие последних с окружающей средой.

Исходя из этого, нами проведен анализ распределения частот генотипов регуляторных регионов генов фактора роста сосудистого эндотелия *VEGF-A2578C, VEGF+T936C*, генов матриксных металлопротеиназ *MMP2-C1306T, MMP3-5A 1171 6A, MMP9-C1569T,* гена фактора некроза опухолей *TNFα-C863A, TNFα-G308A, TNFα-G238A* и их комбинаций у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией.

Материалы и методы

Пациенты

Было обследовано 202 пациента (404 глаза), прошедших диагностическое обследование на базе Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» в 2013-2015 году. Все пациенты в зависимости от наличия ВМД были разделены на 2 группы. Основную группу составили 102 пациента (204 глаза). Критерием включения в основную группу пациентов являлось наличие диагноза ВМД и возраст старше 60 и менее 70 лет. Количество женщин в обследованной группе составило 82 человек, мужчин – 20 человек. Средний возраст пациентов – 64,298±0,409 года. Группу сравнения составили 100 пациентов (200 глаз). Критерием включения в группу сравнения явилось отсутствие у обследуемых диагноза ВМД. Количество женщин в группе – 82, мужчин – 18 человек. Средний возраст – 63,449±0,369 лет. Обе группы пациентов достоверно не различались по возрастным и половым характеристикам.

Критерием исключения для обеих групп являлось: наличие у пациентов острых и обострения хронических воспалительных заболеваний органа зрения, глаукомы, увеита различной этиологии, полной осложненной катаракты, отслойки сетчатки, рубеоза радужки. Из исследования исключались пациенты с сахарным диабетом, аутоиммунными и опухолевыми процессами любой локализации. Диагноз ВМД выставлен на основании стандартного офтальмологического обследования, включающего визометрию, тонометрию, биомикроскопию, офтальмоскопию, периметрию, оптическую когерентную томографию макулярной области. В исследование включены пациенты с 3-4 категорией, соответственно классификации по AREDS. Исследование было одобрено комитетами по биомедицинской этике Новосибирского филиала ФГБУ «МНТК „Микрохирургия глаза“ им. акад. С.Н. Федорова» и Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии». У всех пациентов было получено информированное согласие на забор крови, а также использование данных исследования в научных целях.

Генотипирование

Генотипирование полиморфизмов промоторного региона генов *VEGF –2578* (rs 699947), *MMP3-1171* (rs 3025058), *MMP9-1562* (rs 3918242), *TNFα-863* (rs1800630), *TNFα-308* (rs1800629), *TNFα-238* (rs 361525) осуществляли методом рестриктазного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ), с использованием специфичных праймеров [5, 6, 21, 26, 29] и эндонуклеаз рестрикции *Bgl II, TthI, SphI, BstBAI*, *Bsp19I, Msp I*

соответственно (СибЭнзим, г. Новосибирск). Электрофорез проводили в 2,5% агарозном геле.

SNP полиморфизм регуляторных регионов генов *VEGF+936* (rs 3025039), и *MMP2-1306* (rs 2438650) анализировали с помощью Real-Time ПЦР с использованием коммерческих тест-систем методом TaqMan зондов (Синтол, Россия) на амплификаторе «ДТ-96» (ДНК-Технология) согласно инструкции фирмы-производителя.

Статистический анализ

При статистическом анализе результатов исследований использовали такие показатели, как частота встречаемости генотипов, отношение шансов (OR) с расчетом 95% доверительного интервала (OR 95%CI). Расчет величины OR проводили по методу Вульфа–Холдейна [1]. Частоту встречаемости отдельных генотипов и их комбинаций определяли как процентное отношение индивидов, несущих генотип (комбинацию генотипов), к общему числу обследованных в группе по формуле: $f = n/N$, где n – количество раз встречаемости генотипа (комбинации), N – численность обследованных. Распределение генотипов по исследованным полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга [2]. Достоверность различий частот распределения изучаемых признаков в альтернативных группах определяли по критерию χ^2 с поправкой Йетса на непрерывность и двустороннему варианту точного метода Фишера для четырехпольных таблиц [3]. Межгрупповые различия по возрасту пациентов оценивали с помощью критерия Манна–Уитни (Statistica 6.1). Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Нами исследовался полиморфизм регуляторных регионов гена *VEGF* в двух полиморфных позициях, трех генов матричных металлопротеиназ *MMP2-1306, MMP3-1171, MMP9-1562* и трех позиций промоторного региона гена *TNFα*: *TNFα-863, TNFα-308, TNFα-238* у пациентов с возрастной макулярной дегенерацией относительно здоровых аналогичного возраста. Частоты генотипов в сопоставляемых группах находятся в равновесии Харди–Вайнберга. Частоты генотипов *TNFα-308 AA* и *TNFα-308 GA* значимо различались между пациентами с ВМД и контрольной группой (OR = 0,22, P = 0,0287 и OR = 2,91 P = 0,0063 соответственно). Не выявлено достоверных различий при анализе частот отдельных генотипов генов *VEGF, MMP2, MMP3, MMP9*, полиморфных позиций *TNFα-863 и TNFα-238* в оппозитных группах (табл. 1).

При анализе комплексных генотипов выявлены только позитивно-ассоциированные с развитием ВМД комплексы *VEGF – MMP* генов с высоким уровнем специфичности. В состав пяти из них входит минорный гомозиготный генотип *VEGF-2578AA,* в составе шестого – гетерозиготная форма этого генотипа (табл. 2). Максимальное значение отношения шансов развития заболевания при наличии у пациентов комплекса *VEGF-2578AA:VEGF+936CC:MMP2-1306CC:MMP3-1171 5A6A* (OR = 10,77; P = 0,0097). Чуть меньшее значение отношения шансов в комплексах *VEGF-2578CA:VEGF+936CT:MMP3-11715A5A* и *VEGF-2578AA:MMP3-11715A6A:MMP9-1562CT* (OR = 8,34; P = 0,0351). Совместный анализ полиморфизма генов *VEGF – TNFα* показал наличие как позитивных, так и негативных комплексных генотипов (табл. 3). Из четырех позитивно-ассоциированных с болезнью комплексов наибольшее значение отношения шансов развития заболевания при наличии в геноме пациента *TNF-308GA:VEGF-2578CA* и *TNF-308GA: TNF-238GG:VEGF-2578CA* (OR = 4,75; P = 0,0047 и OR = 4,09; P = 0,0142 соответственно). Наибольший протективный эффект показал сложный генотип *TNF-863CA:TNF-308GG:TNF-238GG: VEGF-2578CA:VEGF+936CC* (OR = 0,30; P = 0,0381).

Еще более значимый уровень различий установлен нами при сравнительном анализе частоты распространения комплексных генотипов, включающих в свой состав 8 полиморфных участков регуляторных областей всех исследуемых генов – *TNFα-VEGF-MMP2, 3, 9.* В таблице 4 представлена часть выявленных генотипов, уровень значения достоверности которых менее 0,01. В большинстве комбинированных генетических комплексов, тесно ассоциированных с развитием ВМД, выявлено наличие гомозиготного генотипа *CC* в полиморфной позиции *-863* гена *TNFα*. Как правило, он сочетается с наличием в генотипе этих же пациентов гомозиготного генотипа *CC* гена *VEGF* в полиморфной позиции *+936*. Анализ аллельного полиморфизма генов металлопротеиназ показал наличие в составе позитивно-ассоциированных комплексных генотипов, гомозиготных вариантов *TT* и *CC* в полиморфных позициях *-1306* и *-1562* генов *MMP2* и *MMP9* соответственно.

Обсуждение

Фактор роста эндотелия сосудов, секретирующийся клетками ретинального пигментного эпителия, – один из важнейших регуляторов патологического ангиогенеза при ВМД, особенно при влажной форме [33]. Высказываются предположения о возможности влияния полиморфизма гена *VEGF* на развитие и течение заболевания, но данные многочисленных исследований в различных популяциях не однородны. По результатам большинства исследований, не выявлено ассоциированности с болезнью при анализе *VEGF-2578* промоторного региона гена [19]. Показанная ассоциированность *VEGF+936* позиции регуля-

ТАБЛИЦА 1. ЧАСТОТА АНАЛИЗИРУЕМЫХ ГЕНОТИПОВ У ПАЦИЕНТОВ С ВМД И В КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППЕ

TABLE 1. FREQUENCY OF THE ASSAYED GENOTYPES IN PATIENTS WITH AMD AND CONTROL GROUP

Полиморфная позиция Polymorphic site	**Генотип** Genotype	**Пациенты** Patients **N = 102 (%)**	**Здоровые** Healthy persons **N = 100 (%)**	**OR**	**OR 95%CI**
VEGF-2578	*AA*	24 (23,54)	19 (19,00)	1,30	0,62-2,70
	AC	55 (53,92)	52 (52,00)	1,10	0,61-1,99
	CC	23 (22,54)	29 (29,00)	0,70	0,35-1,39
VEGF+936	*CC*	74 (72,55)	71 (71,00)	1,08	0,56-2,08
	CT	27 (26,47)	26 (26,00)	1,02	0,52-2,01
	TT	1 (0,98)	3 (3,00)	0,01	0,32-3,53
MMP2-1306	*CC*	53 (51,96)	54 (54,00)	0,94	0,52-1,70
	TC	31 (30,40)	35 (35,00)	0,73	0,38-1,42
	TT	18 (17,64)	11 (11,00)	1,67	0,77-3,65
MMP3-1171	*5A5A*	18 (17,65)	20 (20,00)	0,86	0,40-1,84
	5A6A	60 (58,82)	52 (52,00)	1,32	0,73-2,39
	6A6A	24 (23,53)	28 (28,00)	0,79	0,40-1,56
MMP9-1562	*CC*	70 (68,63)	65 (65,00)	1,18	0,63 –2,21
	CT	30 (29,41)	31 (31,00)	0,93	0,49-1,77
	TT	2 (1,96)	4 (4,00)	0,48	0,06-3,14
TNFα-238	*AA*	1 (0,98)	1 (1,00)	0,98	0,03-36,40
	GA	11 (10,78)	7 (7,00)	1,61	0,55-4,83
	GG	90 (88,24)	92 (92,00)	0,65	0,23-1,62
TNFα-308	*AA*	3 (2,94)	12 (12,00)	0,22*	0,05-0,88
	GA	29 (28,43)	12 (12,00)	2,91**	1,31-6,54
	GG	70 (68,63)	76 (76,00)	0,71	0,36-1,39
TNFα-863	*AA*	0 (0,00)	2 (2,00)	0,00	0,00-4,00
	CA	24 (23,53)	33 (33,00)	0,62	0,32-1,21
	CC	78 (76,47)	65 (65,00)	1,75	0,91-3,39

Примечание.* p = 0,0287; p = **0,0063; OR – отношение шансов; OR 95%CI – доверительный интервал для OR.

Note. OR, odds ratio; OR 95%CI, Confidence Interval for OR.

ТАБЛИЦА 2. ПОЗИТИВНО АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВМД КОМПЛЕКСНЫЕ ГЕНОТИПЫ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

TABLE 2. COMPOUND GENOTYPES OF VASCULAR ENDOTHELIAL GROWTH FACTOR (VEGF) AND MATRIX METALLOPROTEINASES (MMP) POSITIVELY ASSOCIATED WITH AMD

Полиморфная позиция Polymorphic site	**Генотип** Genotype	**Пациенты** Patients **N = 102 (%)**	**Здоровые** Healthy persons **N = 99 (%)**	**OR**	**OR 95%CI**	**P**
VEGF-2578:MMP3-1171	*AA-5A6A*	18 (17,65)	7 (7,07)	2,82	1,12-7,08	0,0315
VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171	*CA-CT-5A5A*	8 (7,84)	1 (1,01)	8,34	1,02-67,98	0,0351
VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171	*AA-CC-5A6A*	15 (14,71)	4 (4,04)	4,09	1,31-12,81	0,0142
VEGF-2578:MMP2-1306:MMP3-1171	*AA-CC-5A6A*	11 (10,89)	3 (3,03)	3,91	1,06-14,48	0,0491
VEGF-2578:MMP3-1171:MMP9-1562	*AA-5A6A-CT*	8 (7,84)	1 (1,01)	8,34	1,02-67,98	0,0351
VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171	*AA-CC-CC-5A6A*	10 (9,90)	1 (1,01)	10,77	1,35-85,80	0,0097

Примечание. OR – отношение шансов, OR 95%CI – доверительный интервал для OR, P – достоверность различий (двусторонний точный метод Фишера).

Note. OR, odds ratio; OR 95%CI, Confidence Interval for OR; P, **p** value (two-tailed Fisher Exact Test).

ТАБЛИЦА 3. ПОЗИТИВНО И НЕГАТИВНО-АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВМД КОМПЛЕКСНЫЕ ГЕНОТИПЫ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ И ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ

TABLE 3. COMPOUND VEGF AND TNF GENOTYPES POSITIVELY AND NEGATIVELY ASSOCIATED WITH AMD

Полиморфная позиция Polymorphic position	**Генотип** Genotype	**Пациенты Patients N = 102 (%)**	**Здоровые** Healthy persons **N = 99 (%)**	**OR**	**OR 95%CI**	**P**
TNF-308:VEGF-2578	*GA-CA*	17 (16,67)	4 (4,04)	4,75	1,54-14,67	0,0047
TNF-308:VEGF+936	*GA-CC*	23 (22,55)	11 (11,00)	2,36	1,08-5,14	0,0379
TNF-863:TNF-308:VEGF-2578	*CC-GA-CA*	13 (12,75)	4 (4,04)	3,47	1,09-11,04	0,0402
TNF-308:TNF-238:VEGF-2578	*GA-GG-CA*	15 (14,71)	4 (4,04)	4,09	1,31-12,81	0,0142
TNF-308:VEGF-2578	*AA-CA*	2 (1,96)	9 (9,09)	0,20	0,04-0,95	0,0315
TNF-308:TNF-238:VEGF-2578	*AA-GG-CA*	2 (1,96)	9 (9,09)	0,20	0,04-0,95	0,0315
TNF-863:TNF-308:VEGF-2578:VEGF+936	*CA-GG-CA-CC*	4 (3,92)	13 (13,13)	0,27	0,08-0,86	0,0226
TNF-863:TNF-308:TNF-238:VEGF-2578:VEGF+936	*CA-GG-GG-CA-CC*	4 (3,92)	12 (12,12)	0,30	0,09-0,95	0,0381

Примечание. OR – отношение шансов, OR 95%CI – доверительный интервал для OR, P – достоверность различий (двусторонний точный метод Фишера).

Note. OR, odds ratio; OR 95%CI, Confidence Interval for OR; P, **p** value (two-tailed Fisher Exact Test).

торного региона гена с влажной формой ВМД для китайской популяции [22] не подтверждается другими исследованиями в этой же популяции и не сохраняется для европейских популяций [11, 12, 23, 31]. Эти данные подтверждаются и результатами исследования в нашей группе пациентов. Единичные работы, посвященные исследованию полиморфизма *MMP* и *TNF*α у пациентов с ВМД, показывают отсутствие прямой ассоциированности полиморфизма этих генов с развитием заболевания [7, 24, 27, 35]. Из единичных полиморфных позиций только для *TNF*α*-308* показана ассоциированность с патологией в нашей группе пациентов, что может быть связано как с популяционными особенностями, так и со сложностью патогенетических механизмов развития заболевания [4].

Учитывая сложность механизмов развития болезни, влияние сетевых факторов, включая генные сети, мы провели анализ сложных генотипов в анализируемых нами группах. В составе пяти из шести выявленных позитивно-ассоциированных с ВМД генотипов *VEGF-MMP* присутствует минорный гомозиготный генотип *VEGF-2578AA*. Установлен факт более высокого уровня продукции фактора роста сосудистого эндотелия клетками у лиц, в геноме которых присутствовал аллель *C* в полиморфной позиции – *2578* [32]. Однако, в исследованиях Habibi I. показано, что полиморфизм *VEGF-2578* не коррелирует с сывороточным уровнем VEGF при ВМД. При этом гомозиготный генотип *VEGF*+936 *CC* связан с более высоким уровнем белка, чем *VEGF+936 CT* и *TT* генотипы при заболевании [14]. В нашей группе именно генотип дикого типа *VEGF+936 CC* выявляется в составе комплекса с максимальным значением отношения шансов развития ВМД *VEGF-2578AA:VEGF+936CC:MMP2-1306CC:MMP3-11715A6A*. В составе этого же комплекса выявляется гомозиготный генотип *MMP2-1306CC*. Ortak H. предположил, что *MMP2 C-1306T* промоторный полиморфизм вряд ли играет существенную роль в риске развития ВМД [27]. В то же время есть данные, что частота *CC* и *CT* генотипов выше у пациентов с ВМД моложе 65 лет, чем у здоровых [25]. Можно предположить, что ассоциированность сложных генотипов с высокими значениями отношения шансов развития ВМД реализуется именно за счет сетевого синергизма, несмотря на то, что в качестве мономаркеров в различных исследованиях роль этих полиморфных позиций сомнительна. Это касается и комплексов *VEGF-TNF*α. Переход к одновременному анализу полиморфизма регуляторных участков генов всей сети кандидатных генов привел к значительному повышению их информационной значимости. Например, представленный в таблице 4 генетический комплекс,

ТАБЛИЦА 4. ПОЗИТИВНО- И НЕГАТИВНО-АССОЦИИРОВАННЫЕ С ВМД КОМПЛЕКСНЫЕ ГЕНОТИПЫ ФАКТОРА РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ, ФАКТОРА НЕКРОЗА ОПУХОЛЕЙ, МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ

TABLE 4. COMPOUND GENOTYPES OF VEGF, TNF AND MMP SHOWING POSITIVE AND NEGATIVE ASSOCIATION WITH AMD

Полиморфная позиция Polymorphic sites	**Генотип** Genotype	**Пациенты** Patients **N = 102 (%)**	**Здоровые** Healthy persons **N = 99 (%)**	**OR**	**OR 95%CI**	**P**
TNF-863:VEGF-2578:MMP2-1306:MMP9-1562	*CC-CA-TT-CC*	8 (7,92)	0 (0,00)	18,09	1,03-317,85	0,0068
TNF-863:VEGF-2578:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	*CC-CA-CC-TT-CC*	8 (7,92)	0 (0,00)	18,09	1,03-317,85	0,0068
TNF-863:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	*CC-CC-TT-CC*	13 (12,87)	1 (1,00)	14,63	1,87-114,08	0,0013
TNF-863:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306:MMP9-1562	*CC-GG-CC-TT-CC*	12 (11,88)	1 (1,00)	13,35	1,70-104,73	0,0025
TNF-308:VEGF+936:MMP2-1306:MMP3-1171	*GA-CC-CC-56*	10 (9,90)	1 (1,00)	10,88	1,37-86,67	0,0097
TNF-863:VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	*CC-CA-CC-56-CC*	18 (17,65)	3 (3,03)	6,86	1,95-24,10	0,0008
TNF-863:VEGF+936:MMP2-1306	*CC-CC-TT*	16 (15,84)	3 (3,00)	6,09	1,71-21,61	0,0029
TNF-863:TNF-238:VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	*CC-GG-CA-CC-56-CC*	16 (15,69)	3 (3,03)	5,95	1,68-21,14	0,0029
TNF-863:TNF-308:VEGF+936:MMP3-1171	*CC-GA-CC-56*	15 (14,71)	3 (3,00)	5,57	1,56-19,91	0,0053
TNF-308:VEGF-2578:MMP9-1562	*GA-CA-CC*	15 (14,71)	3 (3,03)	5,52	1,54-19,71	0,0053
TNF-863:TNF-238:VEGF+936:MMP2-1306	*CC-GG-CC-TT*	14 (13,86)	3 (3,00)	5,20	1,45-18,72	0,0094
TNF-308:VEGF+936:MMP3-1171	*GA-CC-56*	18 (17,65)	4 (4,00)	5,14	1,67-15,80	0,0026
TNF-308:TNF-238:VEGF-2578:MMP9-1562	*GA-GG-CA-CC*	14 (13,73)	3 (3,03)	5,09	1,42-18,31	0,0095
TNF-863:VEGF+936:MMP3-1171:MMP9-1562	*CC-CC-56-CC*	28 (27,45)	11 (11,00)	3,06	1,43-6,56	0,0040
TNF-863:TNF-308:VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171	*CA-GG-CA-CC-56*	2 (0,98)	11 (10,10)	0,09	0,01-0,70	0,0095
TNF-863:TNF-308:TNF-238:VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171	*CA-GG-GG-CA-CC-56*	2 (0,98)	11 (9,09)	0,10	0,01-0,80	0,0095
TNF-238:VEGF-2578:MMP3-1171:MMP9-1562	*GG-CA-56-CT*	2 (1,96)	12 (12,12)	0,15	0,03-0,67	0,0051
TNF-863:TNF-308:VEGF-2578:MMP3-1171	*CA-GG-CA-56*	1 (1,96)	9 (11,11)	0,16	0,03-0,74	0,0090
TNF-863:VEGF-2578:VEGF+936:MMP3-1171	*CA-CA-CC-56*	1 (1,96)	10 (11,11)	0,16	0,03-0,74	0,0046

Примечание. OR – отношение шансов; OR 95%CI – доверительный интервал для OR; P – достоверность различий (двусторонний точный метод Фишера).

Note. OR, odds ratio; OR 95%CI, Confidence Interval for OR; P, **p** value (two-tailed Fisher Exact Test).

содержащий информацию о наличии в геноме пациента гомозиготного варианта *CC* в позиции *-863* гена *TNFα*, ассоциированного с более низким уровнем продукции самого фактора некроза опухоли [34], гомозиготных вариантов *TT* и *CC* в позициях *-1306* и *-1562* генов *MMP2* и *MMP9* соответственно, также ассоциированных с более низкой продукцией самих ферментов [20, 30] и гомозиготного варианта *CC* в позиции *+963* гена *VEGF*, напротив, ассоциированного с более высоким уровнем продукции фактора роста сосудистого эндотелия [14], не только свидетельствует о генетической предрасположенности индивида к высокому уровню базовой продукции фактора роста сосудистого эндотелия в сочетании с низким уровнем продукции фактора некроза опухолей и металлопротеиназ 2 и 9, но и характеризуется высокоинформативными характеристиками. Так, полное отсутствие этого генотипа в контрольной группе приводит к величине отношения шансов OR = 18,09; p = 0,006. Как видно из таблицы, для пациентов с ВМД характерно наличие в геноме тех аллельных вариантов, которые предрасполагают к развитию ангиогенеза, наряду с низким уровнем продукции провоспалительных регуляторных факторов и ферментов, участвующих в разрушении межклеточного матрикса при ремоделировании тканей.

Закономерное выявление в составе комплексных прогностически значимых генетических признаков гомозиготных генотипов *VEGF,* ассоциированных с высоким уровнем продукции этого фактора роста сосудов (*+936 CC*), вероятно связано с формированием хориоидальной неоваскулярной мембраны при ВМД, представленной кровеносными сосудами в слое сетчатки глаза. Другими словами, в этом случае мы имеем дело с очевидно высокой степенью реализации факторов генетической предрасположенности к развитию автологических процессов в глазе, с его клиническими фенотипическими проявлениями. Наличие в составе этих генетических комплексов аллелей гена *TNFα*, ассоциированных с низким уровнем экспрессии и продукции фактора некроза опухолей, отражает, вероятно, конкурентный характер сетевых взаимоотношений между локусами количественных признаков сцепленных с генами *VEGF* и *TNFα*. Этот вывод находит свое подтверждение в данных о способности TNF ингибировать продукцию VEGF в клеточных культурах [16]. Схожие закономерности можно отнести и к взаимоотношениям генов *VEGF*, группы генов *MMP* и их белковых продуктов, находящихся как в прямых, так и обратных связях [15].

На наш взгляд, представленные данные убедительно свидетельствуют о том, что использование комплексных генетических факторов, продукты которых принимают участие в патологическом процессе, с одной стороны, и являются регуляторами продукции в отношении друг друга, с другой стороны, имеет большую информативность при выявлении протективных и резистентных маркеров развития заболевания, чем одиночные генетические маркеры и могут быть использованы при скрининговых исследованиях. Кроме того, знания о сетевых взаимодействиях играют несомненную роль в понимании терапевтических эффектов анти-VEGF-препаратов.

Список литературы / References

1. Бабич П.Н., Чубенко А.В., Лапач С.Н. Применение современных статистических методов в практике клинических исследований. Сообщение третье. Отношение шансов: понятия, вычисление и интерпретация // Украинский медицинский журнал, 2005. Т. 46, № 2. С. 113-119. [Babich P.N., Chubenko A.V., Lapach S.N. Application of modern statistical methods in clinical trials. Part 3. Odds ratio: concept, computation and interpretation. *Ukrainskiy meditsinskiy zhurnal = Ukrainian Medical Journal, 2005, Vol. 46, no. 2, pp. 113-119.* (In Russ.)]

2. Вейр Б. Анализ генетических данных. Дискретные генетические признаки. Пер. с англ. М.: Мир, 1995. 400 с. [Weir B.S. Genetic Data Analysis II: Methods for Discrete Population Genetic Data. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts]. Moscow: World, 1995. 400 p.

3. Гланц С. Медико-биологическая статистика. Пер. с англ. М.: Практика, 1998. 459 с. [Glantz S.A. Primer of Biostatistics]. Mcgraw-Hill (Tx); 4th edition. 1997. 473 p.

4. Ambati J., Atkinson J.P., Gelfand B.D. Immunology of age-related macular degeneration. *Nat. Rev. Immunol., 2013, Vol. 13, no. 6, pp. 438-451.*

5. Asghar T., Yoshida S., Kennedy S., Negoro K., Zhuo W., Hamana S., Motoyama S., Nakago S., Barlow D., Maruo T. The tumor necrosis factor-a promoter-1031C polymorphism is associated with decreased risk of endometriosis in a Japanese population. *Human Reproduction, 2004, Vol. 19, no. 11, pp. 2509-2514.*

6. Banyasz I., Szabo S., Bokodi G., Vannay A., Vasarhelyi B., Szabo A., Tulassay T., Rigo J. Jr. Genetic polymorphisms of vascular endothelial growth factor in severe preeclampsia. *Mol. Hum. Reprod., 2006, Vol. 12, pp. 233-236.*

7. Bonyadi M.H.J., Bonyadi M., Ahmadieh H., Fotuhi N., Shoeibi N., Saadat S., Yagubi Z., Tumor Necrosis Factor Gene Polymorphisms in Advanced Non-exudative Age-related Macular Degeneration. *Journal of Ophthalmic and Vision Research, 2015, Vol. 10, no. 2, pp. 155-159.*

8. Bulgu Y., Cetin G.O., Caner V., Cetin E.N., Yaylali V., Yildirim C. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration in a Turkish population. *International Journal of Ophthalmology, 2014, Vol. 7, no. 5, pp. 773-777.*

9. Clauss M., Sunderkötter C., Sveinbjörnsson B., Hippenstiel S., Willuweit A., Marino M., Haas E., Seljelid R., Scheurich P., Suttorp N., Grell M., Risau W. A permissive role for tumor necrosis factor in vascular endothelial growth factor-induced vascular permeability. *Blood, 2001, Vol. 97, pp. 1321-1329.*

10. Funahashi Y., Shawber C., Sharma A., Kanamaru E., Choi Y.K., Kitajewski J. Notch modulates VEGF action in endothelial cells by inducing matrix metalloprotease activity. *Vasc. Cell., 2011, Vol. 3, p. 2.* doi: 10.1186/2045-824X-3-2

11. Galan A., Ferlin A., Caretti L., Buson G., Sato G., Frigo A.C., Foresta C. Association of age-related macular degeneration with polymorphisms in vascular endothelial growth factor and its receptor. *Ophthalmology, 2010, Vol. 117, no. 9, pp. 1769-1774.*

12. Gonçalves F.T.I., Cezario S.M., Calastri M.C.J., Oliveira C.I.F., Souza D.R.S., Pinhel M.A.S., Cotrim C.C., Jorge R., Siqueira R.C. Influence of VEGF-C936T genetic variant on age-related macular degeneration. *Arq. Bras. Oftalmol., 2015, Vol. 78, no. 5, pp. 290-294.*

13. Gorin M.B. Genetic insights into age-related macular degeneration: controversies addressing risk, causality, and therapeutics. *Mol. Aspects Med., 2012, Vol. 33, no. 4, pp. 467-486.*

14. Habibi I., Sfar I., Chebil A., Kort F., Bouraoui R., Jendoubi-Ayed S., Makhlouf M., Abdallah T.B., Matri L.E., Gorgi Y. Vascular endothelial growth factor genetic polymorphisms and susceptibility to age-related macular degeneration in Tunisian population. *Biomarker Research, 2014, Vol. 2, no. 15.*

15. Hollborn M., Stathopoulos C., Steffen A., Wiedemann P., Kohen L., Bringmann A. Positive feedback regulation between MMP-9 and VEGF in human RPE cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2007, Vol. 48, no. 9, pp. 4360-4367.*

16. Honorati M.C., Cattini L., Facchini A. IL-17, IL-1beta and TNF-alpha stimulate VEGF production by dedifferentiated chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage., 2004, Vol. 12, no. 9, pp. 683-691.*

17. Huang C., Xu Y., Li X., Wang W. Vascular endothelial growth factor A polymorphisms and age-related macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Molecular Vision, 2013, Vol. 19, pp. 1211-1221.*

18. Hussain A.A., Lee Y., Zhang J.-J., Marshall J. Disturbed Matrix Metalloproteinase Activity of Bruch's Membrane in Age-Related Macular Degeneration. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2011, Vol. 52, no. 7, pp. 4459-4466.*

19. Kepez Y.B., Ozdek S., Ergun M.A., Ergun S., Yaylacioglu T.F., Elbeg S. CFH Y402H and VEGF Polymorphisms and Anti-VEGF Treatment Response in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Res., 2016, Vol. 56, pp. 132-138.*

20. Lamblin N., Bauters Ch., Hermant X., Lablanche J.M., Helbecque N., Amouyel P. Polymorphisms in the Promoter Regions of MMP-2, MMP-3, MMP-9 and MMP-12 Genes as Determinants of Aneurysmal Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol., 2002, Vol. 40, no. 1, pp. 43-48.*

21. Li H.Q., Li Z., Liu Y., Li J.H., Dong J.Q., Gao J.R., Gou C.Y., Li H. Association of polymorphism of tumor necrosis factor-alpha gene promoter region with outcome of hepatitis B virus infection. *World J. Gastroenterol., 2005, Vol. 11, no. 33, pp. 5213-5217.*

22. Lin J.M., Wan L., Tsai Y.Y., Lin H.J., Tsai Y., Lee C.C., Tsai C.H., Tseng S.H., Tsai F.J. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Am. J. Ophthalmol., 2008, Vol. 145, pp. 1045-1051.*

23. Liu Y., Hou S., Lang W., Dai D., Wang Z., Ji X., Li K., Zhang X., Zou Y., Wang J. Roles of three common VEGF polymorphisms in the risk of age-related macular degeneration. *Genet. Test. Mol. Biomarkers, 2014, Vol. 18, no. 4, pp. 245-252.*

24. Liutkeviciene R., Lesauskaite V., Sinkunaite-Marsalkiene G., Zaliuniene D., Zaliaduonyte-Peksiene D., Mizariene V., Gustiene O., Jasinskas V., Jariene G.,Tamosiunas A. The Role of Matrix Metalloproteinases Polymorphisms in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Genet., 2015, Vol. 36, no. 2, pp. 149-155.*

25. Liutkeviciene R, Lesauskaite V., Zaliaduonyte-Peksiene D., Sinkunaite-Marsalkiene G., Zaliuniene D., Mizariene V., Gustiene O., Jasinskas V., Tamosiunas A. Role of MMP-2 (-1306 C/T) Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmic Genetics, 2016, Vol. 37, no. 2, pp. 170-176.*

26. Okamoto K., Mimura K., Murawak Y., Yuasa I. Association of functional gene polymorphisms of matrix metalloproteinase MMP-1, MMP-3 and MMP-9 with the progression of chronic liver disease. *J. Gastr. Hepatol, 2005, Vol. 20, no. 7, pp. 1102-1108.*

27. Ortak H., Demir S., Ateş O., Benli İ., Sogut E., Sahin M. The Role of MMP2 (-1306C>T) and TIMP2 (-418 G>C) Promoter Variants in Age-related Macular Degeneration. *Ophthalmic Genetics, 2013, Vol. 34, no. 4, pp. 217-222.*

28. Parmeggiani F., Romano M.R., Costagliola C., Semeraro F., Incorvaia C., D'Angelo S., Perri P., De Palma P., De Nadai K., Sebastiani A. Mechanism of inflammation in age-related macular degeneration. *Mediators Inflamm., 2012, Vol. 2012, Article ID 546786, 16 p.*

29. Patino-Garcia A., Sotillo-Pineiro E., Modesto C., Sierrasesumaga L. Screening of the Tumor Necrosis Factor-Alpha gene Promoter Polymorphisms by PCR-DGGE analysis. *Mutation Research Genomics, 1999, Vol. 406, no. 2, pp. 121-125.*

30. Pollanen P., Lehtimaki T., Mikkelsson J., Ilveskoski E., Kunnas T., Perola M., Penttilä A., Mattila K.M., Nikkari S.T., Syrjäkoski K., Karhunen P.J. Matrix metalloproteinase 3 and 9 gene promoter polymorphisms: joint action of two loci as a risk factor for coronary artery complicated plaques. *Atherosclerosis, 2005, Vol. 180, no. 1, pp. 73-78.*

31. Qu Y., Dai H., Zhou F., Zhang X., Xu X., Bi H., Pan X., Wang H., Jiang H., Yin N., Dang G. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms and risk of neovascular age-related macular degeneration in a Chinese cohort. *Ophthalmic Res., 2011, Vol. 45, no.3, pp. 142-148.*

32. Shahbazi M., Fryer A.A., Pravica V., Brogan I.J., Ramsay H.M., Hutchinson I.V., Harden P.N. Vascular endothelial growth factor gene polymorphisms are associated with acute renal allograft rejection. *J. Am. Soc. Nephrol., 2002, Vol. 13, no. 1, pp. 260-264.*

33. Tatar O., Kaiserling E., Adam A., Gelisken F., Shinoda K., Volker M., Lafaut B.A., Bartz-Schmidt K.U., Grisanti S. Consequences of verteporfin photodynamic therapy on choroidal neovascular membranes. *Arch. Ophthalmol., 2006, Vol. 124, no. 6, pp. 815-823.*

34. Udalova I.A., Richardson A., Denys A., Smith C., Ackerman H., Foxwell B., Kwiatkowski D. Functional Consequences of a Polymorphism Affecting NF-κB p50-p50 Binding to the TNF Promoter Region. *Molecular and Cellular Biology, 2000, Vol. 20, no. 24, pp. 9113-9119.*

35. Wan L., Lin H.J., Tsai Y., Lee C.C., Tsai C.H., Tsai F.J., Tsai Y.Y., Lin J.M. Tumor necrosis factor-α gene polymorphisms in age-related macular degeneration. *Retina, 2010, Vol. 30, no. 10, pp. 1595-1600.*

Авторы:

Шевченко А.В. *— д.б.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», г. Новосибирск, Россия*

Прокофьев В.Ф. *— к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клинической иммуногенетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», г. Новосибирск, Россия*

Коненков В.И. *— д.м.н., профессор, академик РАМН, руководитель лаборатории клинической иммуногенетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт клинической и экспериментальной лимфологии», г. Новосибирск, Россия*

Черных В.В. *— д.м.н., профессор, директор Новосибирского филиала ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия*

Еремина А.В. *— врач-офтальмолог, Новосибирский филиал ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия*

Дудникова Л.В. *— врач-офтальмолог, Новосибирский филиал ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия*

Кашкина Н.Ю. *— врач-офтальмолог, Новосибирский филиал ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия*

Трунов А.Н. *— д.м.н., профессор, заместитель директора по научной работе Новосибирского филиала ФГАУ «МНТК „Микрохирургия глаза" им. акад. С.Н. Федорова» Министерства здравоохранения РФ, Новосибирский филиал, г. Новосибирск, Россия*

Authors:

Shevchenko A.V.*, PhD, MD (Biology), Leading Research Associate, Laboratory for Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian Federation*

Prokofyev V.F.*, PhD (Medicine), Leading Research Associate Laboratory for Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian Federation*

Konenkov V.I.*, PhD, MD (Medicine), Full Member, Russian Academy of Medical Sciences, Head, Laboratory for Clinical Immunogenetics, Research Institute of Clinical and Experimental Lymphology, Novosibirsk, Russian Federation*

Chernykh V.V.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Eye Microsurgery Complex, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation*

Eremina A.V.*, Ophthalmologist, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Eye Microsurgery Complex, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation*

Dudnikova L.V.*, Ophthalmologist, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Eye Microsurgery Complex, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation*

Kashkina N.Yu.*, Ophthalmologist, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Eye Microsurgery Complex, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation*

Trunov A.N.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director for Research, S. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Eye Microsurgery Complex, Novosibirsk Branch, Novosibirsk, Russian Federation*

Поступила 09.01.2017
Принята к печати 26.01.2017

Received 09.01.2017
Accepted 26.01.2017

ЭКСПРЕССИЯ МАТРИКСНЫХ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗ В СЛЕЗЕ И ПОЛИМОРФИЗМ ГЕНА ФАКТОРА КОМПЛЕМЕНТА Н (CFH) У БОЛЬНЫХ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ

Соколов В.А.[1], Лихванцева В.Г.[2], Леванова О.Н.[1], Никифоров А.А.[1], Выгодин В.А.[3]

[1] ФГБУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия
[2] ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия
[3] ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Цель – изучить продукцию матриксных металлопротеиназы-2 и -9 в слезной жидкости и полиморфизм гена CFH в популяции больных первичной открытоугольной глаукомой.

Исследование проведено на 120 глазах больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ), из них 34 глаза с начальной стадией, 35 глаз – с развитой, 35 – с далекозашедшей стадией и 16 глаз – с терминальной стадией. Контролем служили 25 пациентов без глаукомы. Объектом биохимического исследования служила слезная жидкость. Уровни ММП-2 и ММП-9 определяли «сэндвич»-методом твердофазного иммуноферментного анализа на обоих глазах.

Материалом генетического исследования служила венозная кровь. Анализу подвергали геномную ДНК человека, выделенную из лейкоцитов цельной крови. Применяли метод ПЦР.

Результаты исследования анализировали с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., США) с применением стандартных алгоритмов вариационной статистики, включая корреляционный анализ и анализ таблиц сопряженности, а также различные типы межгруппового сравнения распределений изучаемых показателей. Установлено, что среднегрупповые показатели металлопротеиназ-2 и -9 увеличиваются по мере прогрессирования заболевания. Проведен корреляционный анализ сопряженности связи между морфометрическими, клинико-функциональными параметрами и количественными показателями ММП-2 и ММП-9. Изучена распространенность полиморфизма гена CFH с учетом стадии развития глаукомы.

Исследование представило доказательства взаимосвязи продукции ММП-2 и ММП-9 с полиморфизмом гена CFH, а также расширило список генетических мутаций, принимающих возможное участие в патогенезе ПОУГ.

Ключевые слова: первичная открытоугольная глаукома, полиморфизм гена CFH, фактор комплемента Н, матриксные металлопротеиназы

Адрес для переписки:
Леванова Ольга Николаевна
ФГБУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ
390026, Россия, г. Рязань, ул. 2-я Линия, 3/40.
Тел.: 8 (920) 631-86-71.
E-mail: Levanova.olga2013@yandex.ru

Address for correspondence:
Levanova Olga N.
I.P. Pavlov Ryazan State Medical University
390026, Russian Federation, Ryazan, 2 Line str., 3, apt 40.
Phone: 7 (920) 631-86-71.
E-mail: Levanova.olga2013@yandex.ru

Образец цитирования:
В.А. Соколов, В.Г. Лихванцева, О.Н. Леванова, А.А. Никифоров, В.А. Выгодин «Экспрессия матриксных металлопротеиназ в слезе и полиморфизм гена фактора комплемента Н (CFH) у больных первичной открытоугольной глаукомой» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 547-556. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-547-556

© Соколов В.А. и соавт., 2017

For citation:
V.A. Sokolov, V.G. Likhvantseva, O.N. Levanova, A.A. Nikiforov, V.A. Vygodin "Expression of matrix metalloproteinases in lacrimal fluid and gene polymorphism of complement factor H (CFH) in patients with primary open-angle glaucoma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 547-556. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-547-556

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-547-556

EXPRESSION OF MATRIX METALLOPROTEINASES IN LACRIMAL FLUID AND GENE POLYMORPHISM OF COMPLEMENT FACTOR H (CFH) IN PATIENTS WITH PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA

Sokolov V.A.[a], Likhvantseva V.G.[b], Levanova O.N.[a], Nikiforov A.A.[a], Vygodin V.A.[c]

[a] *I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation*
[b] *The Institute of Advanced Training, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation*
[c] *State Research Center for Preventive Medicine, Moscow, Russian Federation*

Abstract. The objective of our study was to evaluate production of matrix metalloproteinase–2 and -9 in lacrimal fluid, as well as CFH gene polymorphism in a group of patients with primary open-angle glaucoma.

The study was performed with 120 eyes of patients with primary open-angle glaucoma (POAG) including 34 eyes from the first-stage disease; 35 eyes, from the 2nd stage; 35, at the 3rd stage of the disorder, and 16 eyes with stage 4 POAG. Control group consisted of 25 glaucoma-free patients. Tear fluid served as a material for biochemical tests. The levels of MMP-2 and MMP-9 were determined by sandwich ELISA for the both eyes. Venous blood was used for genetic studies. Genomic human DNA was isolated from the whole blood leukocytes, a polymerase chain reaction (PCR) was performed.

The results of this study were analyzed using a package of SAS applied statistical programs (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., USA) employing standard algorithms of variation statistics, i.e., correlation analysis, contingency tables, and various types of intergroup comparisons for the parameters studied. The following results were obtained: average indices for metalloproteinases-2 and -9 were found to be increased upon progression of the disease. Correlation analysis of contingency relationships was performed for morphometric, clinical, functional parameters, and quantitative indices of MMP-2 and MMP-9. We also studied prevalence of CFH gene polymorphismic alleles depending on the stage of glaucoma development. One may conclude that our study provided evidence for a relationship between MMP-2 and MMP-9 production, and CFH gene polymorphism, thus expanding a list of host genetic mutations which could be potentially involved into pathogenesis of primary open-angle glaucoma.

Keywords: primary open-angle glaucoma, complement factor H, gene CFH, polymorphism, matrix metalloproteinases

Введение

Первичная открытоугольная глаукома (ПОУГ) – тяжелое нейродегенеративное заболевание. Сочетание малосимптомного, торпидного течения с необратимым органическим поражением зрительного нерва неизбежно приводит к утрате зрительных функций. Несмотря на 200-летнюю историю изучения проблемы, многие аспекты патогенеза глаукомы остаются не до конца изученными [2]. Клинические и экспериментальные исследования последних лет подтвердили участие иммунной системы в нейродегенеративных реакциях, развивающихся в сетчатке и зрительном нерве, а также в более высоких отделах зрительного тракта при ПОУГ [6,13,30]. Активизация аутоиммунитета при глаукоме доказана работами Tezel G. (2007; 2009) [31, 33], Wax M.B. (2009) [35], Курышевой Н.И. (2006) [1], Лихванцевой В.Г. и соавт. (2014) [3]. Длительное и непрерывно прогрессирующее течение болезни, постепенное вовлечение в процесс всех структур глаза, расширение спектра аутоантител подтверждает иммунный ответ при ПОУГ [4]. Это объясняет смещение ракурса исследований в сторону лабораторной диагностики: молекулярно-генетической, иммунологической и др. В активной разработке поиск маркеров, позволяющих прогнозировать вероятность развития и характер клинического течения ПОУГ [16]. В этом аспекте привлекают матриксные металлопротеиназы (ММП).

Иммунная система осуществляет надзор за постоянством гомеостаза. Сбой в ее регуляции способствует превращению защитных механизмов в орудие повреждения. Иммунной агрессии подвергаются собственные нейроны: ганглиозные клетки сетчатки (ГКС), их синапсы и аксоны [32, 34]. Депозиты белков комплемента в сетчатке глаз с терминальной глаукомой подтверждают ее участие в патогенезе ПОУГ [17, 28]. Система комплемента является неотъемлемой частью врожденного иммунитета и предназначена для очистки от нежелательных клеток, инфекционных агентов и продуктов клеточного распада [37].

Она регулируется несколькими белками, включая фактор комплемента H (CFH). Доказано участие комплемента в деструкции синапсов центральной нервной системы (ЦНС) [22, 29], что делает его причастным к нейродегенеративным заболеваниям, включая глаукому [12, 14, 22, 24].

На экспериментальной модели глаукомы у мыши DBA/2J ПОУГ манифестировала активацией воспалительных реакций с участием каскада комплемента. Следом повышалось внутриглазное давление (ВГД) и запускался апоптоз ганглионарных клеток сетчатки (ГКС) [12, 25, 27]. Представлены доказательства прямой связи неконтролируемой активации системы комплемента с прогрессированием дегенерации ГКС, их синапсов и аксонов при ПОУГ. Контролирующие функции гена CFH нарушаются при мутации фактора H, приводя к гиперэкспрессии компонентов комплемента (C5, C3, C1q). Поэтому изучение полиморфизма гена CFH признано перспективным направлением исследований у больных ПОУГ [12, 14, 22].

С другой стороны, ответственность за преобразование экстраклеточного матрикса (ЭКМ) с последующим ремоделированием диска зрительного нерва (ДЗН) возлагают на матриксные металлопротеиназы (ММП) [20]. Морфологические исследования структур глаза человека и животных подтверждают их гиперэкспрессию при глаукоме в трабекулярной сети [7, 9, 11], в шлеммове канале [23], в сетчатке [8, 10], решетчатой пластине склеры [36] и диске зрительного нерва [19]. Предполагают наличие причинно-следственной связи между уровнем ММП и реакциями ремоделирования ДЗН и сетчатки. В связи с чем концентрацию ММП определяют во внутриглазной жидкости [15, 21, 26], в сыворотке крови, слезной жидкости. Продукция ММП находится под контролем иммунной системы [5].

К настоящему времени не установлено, как связаны между собой полиморфизм гена CFH и экспрессия ММП. Между тем, оба маркера ассоциируются с развитием и прогрессированием ПОУГ.

Цель исследования – изучить продукцию матриксных металлопротеиназы–2 и -9 в слезной жидкости и полиморфизм гена CFH в популяции больных первичной открытоугольной глаукомой.

Материалы и методы

Работа представляет собой статическое исследование, в ходе которого методом рандомизации осуществляли набор пациентов с ПОУГ. Пациентов обследовали на базе поликлинического отделения Государственного бюджетного учреждения Рязанской области «Клиническая больница им. Н.А. Семашко».

Критерии включения в исследования: пациенты с впервые выявленной ПОУГ.

Критерии исключения: нормотензивная, закрытоугольная и псевдоэксфоллиативная глаукома, операции, травмы, воспалительные и аутоиммунные заболевания глаз в анамнезе, заболевания сетчатки и зрительного нерва, помутнение роговицы, затрудняющие осмотр глазного дна, аметропия высокой степени; тяжелая соматическая патология (инфаркт миокарда, инсульт, флеботромбоз), острые заболевания печени и почек, нейроэндокринные, психические заболевания.

Соматический статус оценивался кардиологом и/или терапевтом и эндокринологом.

Материалом для исследования служили 66 (120 глаз) больных с различными стадиями ПОУГ; из них 23 женщины и 43 мужчины. Возрастной коридор обследованных больных ПОУГ колебался от 39 до 79 лет, составляя в среднем 63,8±0,74 года. Из них: на 34 глазах была 1 стадия, на 35 – 2 стадия, на 35 глазах – 3 стадия, и в 16 глазах- 4 стадия заболевания. В нашей популяции ПОУГ на 12 глазах заболевание еще не проявилось.

Контролем служили 25 пациентов без ПОУГ, аналогичного возрастного коридора и частоты сопутствующей патологии. Из них: 15 мужчин и 10 женщин, средний возраст 65,0±1,6 года (от 47 до 77 лет). В контроль не входили лица с отягощенным анамнезом по глаукоме (наследственная форма ПОУГ). Группа контроля была рандомизирована по гендерному признаку, возрасту, распространенности сердечно-сосудистых заболеваний, аметропиям. Такой подход минимизировал роль этих факторов риска, способствуя более точной оценке роли ММП-2, ММП-9 во взаимосвязи с генотипом CFH.

ПОУГ диагностировали в соответствии с Федеральными стандартами диагностики первичной открытоугольной глаукомы (код МКБ: 40.1).

Всем пациентам проводили офтальмологическое обследование:

– визометрию;
– биомикроскопию;
– авторефрактометрию;
– офтальмоскопию;
– тонометрию;
– тонографию (GlauTest-60) – определяли следующие показатели: истинное внутриглазное давление Po (мм рт. ст.), коэффициент легкости оттока внутриглазной жидкости C (мм^3/мин/мм рт. ст.), минутный объем секреции внутриглазной жидкости F (мм^3/мин), V (объем вытесненной за время тонографии из передней камеры глаза внутриглазной жидкости; мм^3), коэффициент Беккера (КБ);
– компьютерную периметрию (OCTOPUS 900, Швейцария) – использовали стандартную пороговую программу 32, рекомендуемую для диагностики глаукомы; пациентам с аномалиями рефракции и пресбиопией компьютерную периметрию проводили в условиях очковой коррекции для близи; анализировали три основных по-

казателя, отражающих данные периметрии: MD (mean deviation) – среднее отклонение дефекта в анализируемой группе от возрастной нормы; MS (mean sensitivity) – средняя внутригрупповая светочувствительность, SLV (corrected loss variance) – корректированная внутригрупповая вариабельность снижения светочувствительности (отражает выраженность очаговых изменений); анализировали локализацию дефектов поля зрения и характер снижения светочувствительности;

– оптическую когерентную томографию (ОКТ) (Stratus 3000, фирма Zeiss, Германия) – оценивали параметры ДЗН и толщину слоя нервных волокон сетчатки (СНВС) в перипапиллярной зоне, толщину сетчатки в различных зонах, верифицируя признаки глаукомного ремоделирования. Данные представляли в виде стандартных протоколов сканирования макулы и ДЗН.

Обследование дополняли лабораторно-генетическими исследованиями.

Концентрацию ММП-2 и ММП-9 в слезной жидкости (СЖ) обоих глаз определяли «сэндвич»-методом твердофазного иммуноферментного анализа. ММП-2 оценивали с помощью тест-набора фирмы BCM Diagnostics, ММП-9 – реактивом фирмы Bander Medsystems. Чувствительность для ММП-2 составляла 0,047 нг/мл, для ММП-9-0,156 нг/мл.

Генетический анализ проводили методом полимеразной цепной реакции. Изучали однонуклеотидные полиморфизмы (SNPs) гена CFH (фактора комплемента H). Генотип определяли по ДНК, выделенной из лейкоцитов цельной периферической крови с помощью реагента «ДНК-экспресс-кровь» и системы SNP-экспресс-РВ (ООО НТП «Литех», Москва).

Результаты исследования анализировали с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., США) с применением стандартных алгоритмов вариационной статистики, включая корреляционный анализ и анализ таблиц сопряженности, а также различные типы межгруппового сравнения распределений изучаемых показателей.

Результаты

Определяли референтные значения для ММП-2 и ММП-9. Было установлено, что концентрация ММП-2 в слезной жидкости здоровых лиц (контроль) составляет в среднем 2,64±0,68 нг/мл, а концентрация ММП-9 – 80,36±14,65 нг/мл. У больных глаукомой концентрация ММП-2 составила 3,59±1,4 нг/мл, а ММП-9 – 136,1±26,4 нг/мл (рис. 1, 2).

Было установлено, что среднегрупповые показатели металлопротеиназ-2 и -9 увеличиваются от стадии к стадии заболевания (табл. 1).

Достоверное повышение концентрации ММП-2 в слезе по сравнению с контролем появлялось только со второй стадии заболевания ($p < 0,001$), показатели сохранялись повышенными на 3 и 4 стадии процесса ($p < 0,001$ и $p < 0,01$). Иными словами, ПОУГ не манифестировала на фоне высокого уровня продукции ММП-2 в слезной жидкости, но переход заболевания с менее продвинутой (первой) на более развитую (вторую или третью) стадию сопровождался ростом концентрации ММП-2. Уровни фермента на далекозашедшей стадии ПОУГ в 1,5 раза превысили контрольные показатели. Продукция ММП-9 имела сходную закономерность с увеличением концентрации от стадии к стадии. Однако достоверная разница по сравнению с контролем проявлялась, начиная с первой стадии заболевания ($p < 0,001$).

Повышение ММП-2 и ММП-9 в слезе глаз с ПОУГ указывало на возможное их участие в патологическом процессе. Будучи маркером ак-

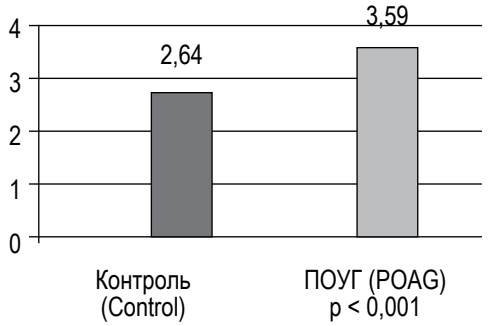

Рисунок 1. Концентрация ММП-2 (нг/мл) в слезе у пациентов группы контроля и больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ)

Figure 1. Concentration of MMP-2 (ng/ml) in lacrimal fluid of control subjects and patients with primary open-angle glaucoma

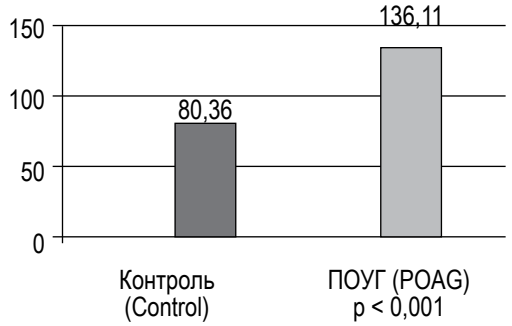

Рисунок 2. Концентрация ММП-9 (нг/мл) в слезе у пациентов группы контроля и больных первичной открытоугольной глаукомой (ПОУГ)

Figure 2. Concentration of MMP-9 (ng/ml) in lacrimal fluid of control subjects and patients with primary open-angle glaucoma

ТАБЛИЦА 1. УРОВЕНЬ ММП-2 И ММП-9 (нг/мл) В СЛЕЗЕ У ПАЦИЕНТОВ ГРУППЫ КОНТРОЛЯ И БОЛЬНЫХ С РАЗЛИЧНЫМИ СТАДИЯМИ ПЕРВИЧНОЙ ОТКРЫТОУГОЛЬНОЙ ГЛАУКОМОЙ (ПОУГ)

TABLE 1. LEVELS OF MMP-2 AND MMP-9 (ng/ml) IN LACRIMAL FLUID OF THE PATIENTS FROM CONTROL GROUP, AND PATIENTS AT DIFFERENT STAGES OF PRIMARY OPEN-ANGLE GLAUCOMA (POAG)

Группы пациентов Groups of patients	**n – количество глаз** n, number of eyes	**ММП-2 (нг/мл)** MMP-2 (ng/ml) Mean±SD	**ММП-9 (нг/мл)** MMP-9 (ng/ml) Mean±SD
Контроль Control	28	2,64±0,68	80,36 ±14,65
1 стадия ПОУГ Stage 1 POAG	34	2,89±0,91 p = 0,23385 (NS)	119,18±17,04 p = 0,00000, p < 0,001
2 стадия ПОУГ Stage 2 POAG	35	3,71±1,27 p = 0,0016, p < 0,001; p_1 = 0,0030, p_1 < 0,01	130,87±24,18 p = 0,00000, p < 0,001; p_1 = 0,02368, p_1 < 0,05
3 стадия ПОУГ Stage 3 POAG	35	3,97±1,62 p = 0,00006, p < 0,001; p_1 = 0,00114, p_1 < 0,01; p_2 = 0,45749 (NS)	146,18±25,44 p = 0,00000, p < 0,001; p_1 = 0,00000, p_1 < 0,001; p_2 = 0,01202, p_2 < 0,05
4 стадия ПОУГ Stage 4 POAG	16	4,0±1,59 p = 0,00439, p < 0,01; p_1 = 0,00289, p_1 < 0,01; p_2 = 0,48821, (NS) p_3 = 0,95104, (NS)	161,56±21,81 p = 0,00000, p < 0,001; p_1 = 0,00000, p_1 < 0,001; p_2 = 0,00007, p_2 < 0,001; p_3 = 0,04184, p_3 < 0,05

Примечание. p – достоверность показателей по сравнению с контрольной группой, p_1 – достоверность показателей по сравнению с 1 стадией ПОУГ, p_2 – со 2 стадией ПОУГ, p_3 – с 3 стадией ПОУГ.

Note. p, significance of differences as compared with control group; p_1, the significance of differences as compared to stage 1 POAG, p_2, to stage 2 POAG, p_3, to stage 3 POAG.

тивности воспаления и деградации экстрацеллюлярного матрикса, дестабилизации клеток и повреждения тканей, ММП-2 и ММП-9 могли свидетельствовать о начале перестройки тканей на уровне трабекулярной сети, сетчатки и головки зрительного нерва. Версию проверяли методом корреляционного анализа (табл. 2).

Таким образом, более высоким значениям ММП-2 и ММП-9 соответствовали признаки усугубления патологического процесса.

Выявлена прямая сопряженная связь между ММП-2 и ММП-9 (коэффициент сопряженности k = 0,647, p < 0,001). Группа глаз с повышенным уровнем ММП-9 в слезе отличалась наибольшей пропорцией глаз (81,82%) с высокими значениями ММП-2 (> 4,0 нг/мл) (табл. 3).

Затем мы попытались установить, как связана продукция ММП-2 и ММП-9 с генотипом CFH и распространенность полиморфизма гена CFH при ПОУГ в целом.

Гомозигот по полиморфизму T402H обозначали как генотип CC, гетерозигот, имеющих только одну аллель T402H, как генотип TC, а гомозигот без данного полиморфизма обозначали как генотип TT.

Было установлено, что распространенность гомозигот с отсутствием полиморфизма гена CFH (генотип TT) составляет 42% популяции ПОУГ и 32% контроля; частота гетерозигот (генотип TC) – 58 и 68% соответственно (рис. 3).

Было установлено, что манифестация ПОУГ ассоциируется с носительством фактора мутации в гене CFH (75% гетерозигот на 1 стадии, генотип TC). От стадии к стадии частота гетерозигот снижается с 75 до 30% (4 стадия, p < 0,05), гомозиготы (генотип TT), напротив, выявляются чаще, достигая 70% к 4 стадии (p < 0,05) (рис. 4).

Превалирование локальных мутаций в гене фактора комплемента H на этапе манифестации ПОУГ косвенно свидетельствовало о том, что

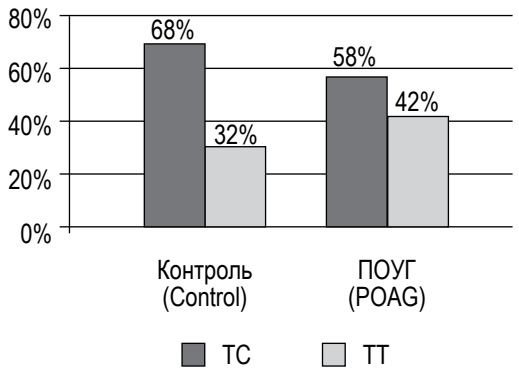

Рисунок 3. Полиморфизм гена CFH в популяции больных первичной открытоугольной глаукомой и в группе контроля

Figure 3. CFH gene polymorphism in a population of patients with primary open-angle glaucoma and in control group

ТАБЛИЦА 2. КОРРЕЛЯЦИОННЫЙ АНАЛИЗ СВЯЗЕЙ (ПО ПИРСОНУ) МЕЖДУ МОРФОМЕТРИЧЕСКИМИ, КЛИНИКО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫМИ ПАРАМЕТРАМИ И КОЛИЧЕСТВЕННЫМИ ПОКАЗАТЕЛЯМИ ММП-2 И ММП-9

TABLE 2. CORRELATION ANALYSIS OF RELATIONSHIPS BETWEEN THE MORPHOMETRIC, CLINICAL AND FUNCTIONAL PARAMETERS (BY PEARSON), AND QUANTITATIVE INDICES OF MMP-2 AND MMP-9

	Морфометрические и клинико-функциональные параметры Morphometric and clinical-functional parameters		**ММП-2** MMP-2	**ММП-9** MMP-9
	Острота зрения с коррекцией Vision with correction	r	-0,32996	-0,52938
		p	< 0,001	< 0,001
Тонографические показатели Tonopgraphic indexes	**Внутриглазное давление (ВГД)** Intraocular pressure (IOP)	r	0,33509	0,21644
		p	< 0,01	< 0,01
	Коэффициент легкости оттока внутриглазной жидкости (С) The easeness coefficient for intraocular fluid outflow (C)	r	-0,1919,	-0,3491
		p	< 0,05	< 0,001
	Минутный объем секреции внутриглазной жидкости (F) Volume of intraocular fluid secretion per min. (F)	r	-0,0771	-0,18857
		p	0,3324 н/д	< 0,05
	Коэффициент Беккера (КБ) The Becker Coefficient	r	0,25611	0,19418
		p	< 0,01	< 0,05
Морфометрические показатели Morphometric indexes	**Средняя толщина фовеа** The average fovea thickness	r	-0,20756	-0,16891
		p	< 0,01	< 0,05
	Общий макулярный объем (мм³) Total macular volume, mm^3	r	-0,27251	-0,48461
		p	< 0,001	< 0,001
	Средняя толщина СНВС The average thickness of the retinal nerve fiber layer	r	-0,38964	-0,59308
		p	< 0,001	< 0,001
	Средняя толщина СНВС в верхних отделах Average thickness of the retinal nerve fiber layer in top segments	r	-0,31155	-0,53015
		p	< 0,001	< 0,001
	Средняя толщина СНВС в нижних отделах Average thickness of the retinal nerve fiber layer in lower segments	r	-0,40373	-0,57124
		p	< 0,001	< 0,001
	Площадь экскавации Square cup	r	0,36984	0,43462
		p	< 0,001	< 0,001
	Отношение экскавации к ДЗН Square cup/ disc ratio	r	0,31095	0,44614
		p	< 0,001	< 0,001
	Отношение экскавации/горизонтальный размер ДЗН Cup/Disk Horizontal Ratio	r	0,29784	0,40315
		p	< 0,001	< 0,001
	Отношение экскавации/вертикальный размер диска Cup/Disk Vertical Ratio	r	0,33069	0,44827
		p	< 0,001	p< 0,001
	Площадь нейроретинального пояска The area of the disc rim	r	-0,30358	-0,43025
		p	< 0,001	< 0,001
Показатели периметрии Perimetric indexes	**MD (mean deviation) – среднее отклонение дефекта в анализируемой группе от возрастной нормы** MD (mean deviation) in the group from age reference values	r	0,33831	0,63614
		p	< 0,001	< 0,001
	MS (mean sensitivity) – средняя внутригрупповая светочувствительность MS (mean sensitivity), mean light sensitivity within the group	r	-0,3383	-0,63684
		p	< 0,001	p< 0,001
	– корректированная внутригрупповая вариабельность снижения светочувствительности SLV (corrected loss variance), corrected variability of light sensitivity within the group	r	0,27873	0,43984
		p	< 0,001	< 0,001
	Среднегрупповая суммарная диффузная светочувствительность Medium total diffuse photosensitivity in the group	r	-0,33769	-0,63483
		p	< 0,001	< 0,001

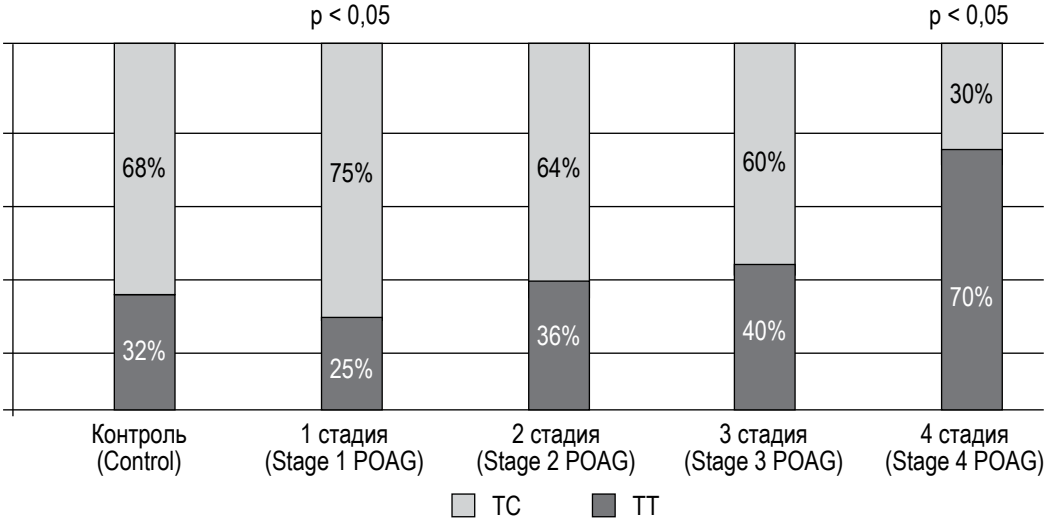

Рисунок 4. Распространенность полиморфизма гена CFH с учетом стадии развития глаукомы

Figure 4. The CFH gene polymorphism at different clinical stages of glaucoma

ТАБЛИЦА 3. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЕЙ ММП-2 ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С УРОВНЕМ ПРОДУКЦИИ ММП-9

TABLE 3. DISTRIBUTION OF MMP-2 LEVELS AND THEIR CORRELATION WITH MMP-9 PRODUCTION LEVELS

Частота в % Frequency of occurrence (%)	**Контроль** Controls		**Группа ПОУГ** POAG group	
	ММП-2 2,0-4,0 нг/мл MMP-2 2.0-4.0 ng/ml	**ММП-2 > 4,0 нг/мл** MMP-2 > 4.0 ng/ml	**ММП-2 2,0-4,0 нг/мл** MMP-2 2,0-4,0 ng/ml	**ММП-2 > 4,0 нг/мл** MMP-2 > 4,0 ng/ml
ММП-9 < 90,0 нг/мл MMP-9 < 90.0 ng/ml	17 60,71%	0 0,00%	0 0,00%	0 0,00%
ММП-9 90,0-130,0 нг/мл MMP-9 90,0-130,0 ng/ml	11 39,29%	0 0,00%	54 55,10%	4 18,18%
ММП-9 > 130,0 нг/мл MMP-9 > 130,0 ng/ml	0 0,00%	0 0,00%	44 44,90%	18 81,82% p < 0,001
Всего Total	28	0	98	22

нарушение регуляции в системе комплемента может стать предрасполагающим фактором, обуславливающим повышенную чувствительность к патогенным механизмам ПОУГ.

Уровень продукции ММП-2 не зависил от принадлежности к генотипу CFH, чего нельзя сказать о продукции ММП-9 (табл. 4). Достоверно чаще повышенные уровни ММП-9 выявлялись у лиц с генотипом ТТ (коэффициент сопряженности $k = 0,650$, $p < 0,001$).

Таким образом, прослеживалась прямая сопряженная связь ММП-9 с генотипом ТТ и с ММП-2, и опосредованная связь ММП-2 с генотипом ТТ.

Обсуждение

Публикации последних лет отражают дискуссию о первичности того или иного феномена. Согласно одной из версий, высокие концентрации металлопротеиназ-2 и -9 обуславливают перестройку трабекулярного аппарата, снижение оттока водянистой влаги и развитию офтальмогипертензии, что в свою очередь ускоряет прогрессирование оптической нейропатии [7, 19].

ТАБЛИЦА 4. РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНА CFH С УЧЕТОМ ПРОДУКЦИИ ММП-9

TABLE 4. DISTRIBUTION OF CFH GENE POLYMORPHISM WITH RESPECT TO MMP-9 PRODUCTION

Частота в % Frequency of detection (%)	**Контроль** Controls		**Группа ПОУГ** POAG group	
	TT	**TC**	**TT**	**TC**
ММП-9 < 90,0 нг/мл MMP-9 < 90.0 (ng/ml)	3 37,50%	14 70,00%	0 0,00%	0 0,00%
ММП-9 90,0-130,0 нг/мл MMP-9 90.0-130.0 (ng/ml)	5 62,50%	6 30,00%	22 36,07%	36 61,02%
ММП-9 > 130,0 нг/мл MMP-9 > 130.0 (ng/ml)	0 0,00%	0 0,00%	39 63,93% p < 0,001	23 39,98%
Всего Total	8	20	61	59

В этом случае гиперэкспрессия ММП-2 и ММП-9 должны предшествовать офтальмогипертензии. По нашим данным, продукция ММП-9 повысилась практически одновременно с офтальмогипертензией или предшествовала ей. Учитывая, что клинически значимое повышение уровня фермента ММП-9 зафиксировано на 1 стадии, а ММП-2 – на 2 стадии заболевания, можно утверждать, что гиперэкспрессия ММП-2 – это, скорее, сопряженный эпифеномен, развивающийся в ответ на повышение уровня продукции ММП-9.

Наряду с этим, более высокие значения ММП-2 и ММП-9 ассоциировались с морфометрическими и функциональными признаками отягощения глаукомного процесса (см. табл. 2). Как известно, отрицательный тканевой гомеостаз, проявляющийся истончением сетчатки и/или отдельных ее структур (СНВС, фовеа, НРП) с уменьшением объема или площади ее топографических зон (макула, фовеа), увеличением экскавации ДЗН сопровождается снижением зрительных функций.

ММП-2 и ММП-9 прямо коррелировали с ВГД, площадью экскавации и его отношением к размерам ДЗН, а также периметрическими индексами MD и SLV. Обратная корреляция прослеживалась с остротой зрения, коэффициентом легкости оттока внутриглазной жидкости, с минутным объемом секреции внутриглазной жидкости, со средней толщиной сетчатки в фовеа, общим макулярным объемом, средней толщиной слоя нервных волокон сетчатки в верхнем и нижнем ее отделах, с площадью нейроретинального пояска (НРП), периметрическим индексом MS.

Известно, что ММП2 совместно с ММП9 участвуют в деградации коллагена IV типа, главного компонента базальных мембран, фиброзно-соединительной оболочки глаза и роговицы. ММП2 может также разрушать другие типы коллагенов (V, VII и X), эластин и фибронектин, модулируя функции различных белков, например, расщеплять моноцитарный хемотаксический белок, приводя к уменьшению воспаления и обеспечивая вазоконстрикцию [20]. Заметим, этот фермент может оказывать как провоспалительный, так и противовоспалительный эффект в зависимости от его концентрации в тканях [18]. Будучи маркером активности воспаления и одновременно деградации ЭКМ, дестабилизации клеток и повреждения тканей, повышенные уровни ММП-2 и ММП-9 ускоряют ремоделирование тканей на уровне трабекулярной сети, сетчатки и головки зрительного нерва. Очередность вступления ферментов свидетельствует о том, если гиперэкспрессия ММП-9 – это реакция глаза в ответ на патогенные механизмы ПОУГ, в то время как гиперэкспрессия ММП-2 – адаптационно-приспособительная реакция, направленная на ингибирование локального воспаления тканей глаза, развившегося на фоне деградации экстрацеллюлярного матрикса и повреждения тканей.

Достоверно чаще концентрация ММП-9 выше у больных с генотипом ТТ гена CFH, чем объяснялась аккумуляция больных с этим генотипом на более высоких стадиях ПОУГ.

Результаты свидетельствуют о том, что гетерозиготы по гену CFH (генотип ТС) имеют предрасположенность к заболеваемости ПОУГ, в то время как гомозиготы (генотип ТТ) более чувствительны к ее патогенным механизмам, отвечая на них более высоким уровнем иммунного

реагирования (включая МПП-2 и ММП-9). У пациентов с генотипом TC гена CFH заболевание протекает медленнее, они дольше остаются на 1 стадии заболевания, а гомозиготы (генотип TT) ассоциируются с более агрессивным течением заболевания.

Таким образом, наше исследование представило доказательства взаимосвязи продукции ММП-2 и ММП-9 с полиморфизмом гена CFH, а также расширило список генетических мутаций, принимающих возможное участие в патогенезе ПОУГ.

Благодарности

Выражаем признательность ректору ФГБОУ ВО РязГМУ Минздрава России профессору Калинину Р.Е. за субсидирование проведенных исследований; заведующему центральной научно-исследовательской лабораторией ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России Никифорову А.А., старшему научному сотруднику научно-исследовательской лабораторией ГБОУ ВПО РязГМУ Минздрава России Никифоровой Л.В. за помощь в выполнении исследования.

Список литературы / References

1. Курышева Н.И. Глаукомная оптическая нейропатия. М.: МЕДпресс-информ, 2006. 136 с. [Kurysheva N.I. Glaukoma optic neuropathy]. Moscow: MEDpress-inform, 2006. 136 p.

2. Либман Е.С., Шахова Е.В., Чумаева Е.А. Глаукома как медико-социальная проблема. Глаукома: сб. науч. тр. МНИИГБ им. Гельмгольца. М., 1998. С. 5-11. [Liebman E.S., Shakhova E. V., Chumaeva E.A. Glaucoma as a health and social problem. Glaucoma: Collection of Scientific Papers of the Helmholtz Moscow Research Institute of Eye Diseases]. Moscow, 1998, pp. 5-11.

3. Лихванцева В.Г., Габибов А.А., Соломатина М.В., Белогуров А.А., Коростелева Е.В., Выгодин В.А. Роль иммунных реакций в патогенезе оптической нейропатии при нормотензивной глаукоме // Национальный журнал «Глаукома», 2014. Т. 13, № 2. С. 17-27. [Likhvantseva V.G., Gabibov A.A., Solomatina M.V., Belogurov A.A., Korostelyova E.V., Vygodin V.A. The role of immune reactions in the pathogenesis of optic neuropathy in normal tension glaucoma. *Natsionalnyy zhurnal "Glaukoma" = National Journal "Glaukoma", 2014, Vol. 13, no. 2, pp. 17-27.* (In Russ.)]

4. Рукина Д.А., Догадова Л.П., Маркелова Е.В., Абдуллин Е.А., Осыховский А.Л., Хохлова А.С. Иммунологические аспекты патогенеза первичной открытоугольной глаукомы // РМЖ «Клиническая офтальмология», 2011. № 4. С. 162. [Rukina D.A., Dogadova L.P., Markelova E.V., Abdullin E.A., Osyhovskiy A.L., Hohlova A.S. Immunological aspects of the pathogenesis of primary open–angle glaucoma. *RMZh "Klinicheskaya oftalmologiya" = Russian Medical Journal "Clinical Ophthalmology", 2011, no. 4, p. 162.* (In Russ.)]

5. Рукина Д.А., Кириенко А.В. Значение матриксной металлопротеиназы в патогенезе первичной открытоугольной глаукомы // Оригинальные исследования, 2011. № 3. С. 41-43. [Rukina D.A., Kirienko A.V. Importance of matrix metalloproteinase in the pathogenesis of primary open angle glaucoma. *Originalnye issledovaniya = Original Researches, 2011, no. 3, pp. 41-43.* (In Russ.)]

6. Abu-Amero K., Morales J., Bosley T. Mitochondrial abnormalities in patients with primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2006, Vol. 47, no. 6, pp. 2533-2541.*

7. Alexander J.P. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitor by human trabecular meshwork. *Invest. Ophthamol. Vis. Sci., 1991,Vol. 32, pp. 172-180.*

8. de Groef L. MMPs in the neuroretina and optic nerve: modulators of glaucoma pathogenesis and repair? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2014, Vol. 55, no. 3, pp. 1953-1964.*

9. de Groef L. MMPs in the trabecular meshwork: promising targets for future glaucoma therapies? *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2013, Vol. 54, no. 12, pp. 7756-7763.*

10. Guo L. Retinal ganglion cell apoptosis in glaucoma is related to intraocular presure and IOP-induced effects on extraccellular matrix. *Invest. Ophthalmol. Sci., 2005, Vol. 46, no. 1, pp. 175-182.*

11. Guo M.S., Wu Y.Y., Liang Z.B. Hyaluronic acid increases MMP-2 and MMP-9 expressions in cultured trabecular meshwork cells from patients with primary open-angle glaucoma. *Mol. Vis., 2012, Vol. 18, pp. 1175-1181.*

12. Howell G. Molecular clustering identifies complement and endothelin induction as early events in a mouse model of glaucoma. *J. Clin. Invest., 2011,Vol. 121, no. 4, pp. 1429-1444.*

13. Izzotti A. Mitochondrial damage in the trabecular meshwork of patients with glaucoma. *Arch. Opthalmol., 2010, Vol. 128, no. 6, pp. 724-730.*

14. Jha P. Complement mediated apoptosis leads to the loss of retinal ganglion cells in animal model of glaucoma. *Mol. Immunol., 2011, Vol. 48, no. 15-16, pp. 2151-2158.*

15. Kara S., Yildirim N., Ozer A., Colak O., Sahin A. Matrix metalloproteinase-2, tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-2, and transforming growth factor beta 1 in the aqueous humor and serum of patients with pseudoexfoliation syndrome. *Clin. Ophthalmol., 2014, Vol. 8, p. 308.*

16. Kowalski M. Matrix metalloproteinases: modern molecular markers of open-angle glaucoma diagnosis and therapy. *Postepy Hig. Med. Dosw., 2008, Vol. 62, pp. 582-592.*

17. Kuehn M. Retinal synthesis and deposition of complement components induced by ocular hypertension. *Exp. Eye Res., 2006, Vol. 83, no. 3, pp. 620-628.*

18. Le N.T. The dual personalities of matrix metalloproteinases in inflammation. *Front. Biosci., 2007, Vol. 12, pp. 1475-1487.*

19. Morgan W.H. The influence of cerebrospinal fluid pressure upon the lamina cribrosa tissue pressure gradient. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 1995, Vol. 36, pp. 1163-1172.*

20. Nagase H., Visse R., Murphy G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovascular Research, 2006, Vol. 69, no. 3, pp. 562-573.*
21. Nga A.D. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the aqueous humour of patients with primary angle closure glaucoma – a quantitative study. *BMC Ophthalmol., 2014, Vol. 14, no. 1, p. 33.*
22. Ren L., Danias J. A role for complement in glaucoma? *Adv. Exp. Med. Biol., 2010, Vol. 703, pp. 95-104.*
23. Ronkoo S., Rekonen P., Kaarnirata K. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in the chamber angle of normal eyes and patient with primary open-angle glaucoma and exfoliation glaucoma. *Greafe's Arch. Clin. Exp. Ophtalmology, 2007, Vol. 245, pp. 697-700.*
24. Rosen A., Stevens B. The role of the classical complement cascade in synapse loss during development and glaucoma. *Adv. Exp. Med. Biol., 2010, Vol. 703, pp. 75-93.*
25. Schlamp C.L. Progressive ganglion cell loss and optic nerve degeneration in DBA/2J mice is variable and asymmetric. *BMC Neurosci, 2006, Vol. 7, p. 66.*
26. Schlötzer-Schrehardt U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in aqueous humor of patients with pseudoexfoliation syndrome/glaucoma and primary open-angle glaucoma. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., 2003, Vol. 44, no. 3, pp. 1117-11125.*
27. Soto I. Retinal ganglion cells downregulate gene expression and lose their axons within the optic nerve head in a mouse glaucoma model. *J. Neurosci., 2008, Vol. 28, no. 2, pp. 548-561.*
28. Stasi K. Complement component 1Q (C1Q) upregulation in retina of murine, primate, and human glaucomatous eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci, 2006, Vol. 47, no. 3, pp. 1024-1029.*
29. Stevens B. The classical complement cascade mediates CNS synapse elimination. *Cell, 2007, Vol. 131, pp. 1164-1178.*
30. Tatton W. Maintaining mitochondrial membrane impermeability: an opportunity for new therapy in glaucoma? *Surv. Ophthalmol., 2001, Vol. 45, pp. 277-283.*
31. Tezel G. The role of glia, mitochondria, and the immune system in glaucoma. *Invest. Ophthalmol., 2009, Vol. 50, pp. 1001-1012.*
32. Tezel G., Wax M. The mechanisms of hsp27 antibody-mediated apoptosis in retinal neuronal cells. *J. Neurosci., 2000, Vol. 20, pp. 3552-3562.*
33. Tezel G., Wax M.B. Glaucoma. *Chem. Immunol. Allergy, 2007, Vol. 92, pp. 221-227.*
34. Wax M.B. Induced autoimmunity to heat shock proteins elicits glaucomatous loss of retinal ganglion cell neurons via activated T-cell-derived fas-ligand. *J. Neurosci., 2008, Vol. 28, no. 46, pp. 12085-12096.*
35. Wax M.B., Tezel G. Immunoregulation of retinal ganglion cell fate in glaucoma. *Exp. Eye Res., 2009, Vol. 88, no. 4, pp. 825-830.*
36. Xu S.L. Expression of matrix metalloproteinases and inhibitors on the scleral tissue of lamina cribrosa in rat with experimental chronic ocular hypertension. *Zhonghua Yan KeZaZhi, 2009, Vol. 45, no. 3, pp. 260-265.*
37. Zipfel P. Complement and immune defense: from innate immunity to human diseases. *Immunol. Lett., 2009, Vol. 126, pp. 1-7.*

Авторы:

Соколов В.А. *– д.м.н., профессор кафедры глазных и ЛОР болезней ФГБУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия*

Лихванцева В.Г. *– д.м.н., профессор, профессор кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации Федерального медико-биологического агентства» России, Москва, Россия*

Леванова О.Н. *– очный аспирант кафедры глазных и ЛОР болезней ФГБУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия*

Никифоров А.А. *– к.м.н., доцент кафедры фармакологии с курсом фармации ФГБУ ВО «Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения РФ, г. Рязань, Россия*

Выгодин В.А. *– заведующий отделом современных методов статистического анализа ФГБУ «Государственный научно-исследовательский центр профилактической медицины» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Authors:

Sokolov V.A.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Ocular and ENT Diseases, I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation*

Likhvantseva V.G.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Ophthalmology, The Institute of Advanced Training, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation*

Levanova O.N.*, Postgraduate Student, Department of Ocular and ENT Diseases, I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation*

Nikiforov A.A.*, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmacology with a Course of Pharmacy, Postgraduate Faculty, I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russian Federation*

Vygodin V.A.*, Head, Department of Modern Statistical Analysis, State Research Center for Preventive Medicine, Moscow, Russian Federation*

Поступила 09.02.2017
Отправлена на доработку 22.02.2017
Принята к печати 14.03.2017

Received 09.02.2017
Revision received 22.02.2017
Accepted 14.03.2017

ПОИСК ТКАНЕЙ-МИШЕНЕЙ В ГЛАЗНОЙ ОРБИТЕ ДЛЯ АУТОИММУННОЙ АГРЕССИИ ТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ ПРИ ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИИ

Лихванцева В.Г.[1], Афанасьев М.С.[2], Руденко Е.А.[1], Караулов А.В.[2], Коростелева Е.В.[1]

[1] ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия

[2] ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Методом корреляционного анализа авторы попытались выявить возможные ткани-мишени тиреоидных аутоантител в орбите при эндокринной офтальмопатии (ЭОП).

Обследовали 139 пациентов (278 глазных орбит) больных эндокринной офтальмопатией, развившейся на фоне диффузного токсического зоба (ДТЗ). Иммунологические показатели (антитела к рецептору тиреотропного гормона, антитела к тиреоглобулину, антитела к тиреопероксидазе – АТ к рТТГ, АТ к ТГ, АТ к ТПО) сопоставляли с данными инструментальной диагностики (мультиспиральная компьютерная томография, ультразвуковое исследование орбиты, экзофтальмометрия) и клинической симптоматикой. Благодаря корреляционному анализу, авторам удалось продемонстрировать разную степень ассоциативной связи тиреоидных антител (АТ к рТТГ, АТ к ТГ, АТ к ТПО) с орбитальными тканями и клиническими проявлениями ЭОП. В частности, по сравнению с серонегативными пациентами носители антител к рТТГ и антител к ТГ отличались более высоким экзофтальмом (19,16±0,26 мм, $p < 0,001$ и 19,41±0,40 мм, $p < 0,05$ соответственно) и суммарным мышечным индексом (2,42±0,05, $p < 0,01$ и 2,42±0,08 н/д соответственно), в то время как у носителей АТ к рТТГ и ТПО сильнее отекали веки (1,01±0,04, $p < 0,001$ и 0,62±0,06, $p < 0,05$ соответственно). Носительство АТ к ТГ ассоциировалось с синхронным вовлечением двух структур орбиты: экстраокулярных мышц и ретробульбарной клетчатки, что нашло отражение в повышении среднегруппового интегрального показателя экзофтальма в группе.

Ключевые слова: эндокринная офтальмопатия, болезнь Грейвса, тиреоидные антитела, антитела к тиреоглобулину, антитела к тиреопероксидазе, глазная орбита, экзофтальм

Адрес для переписки:
Руденко Евгения Александровна
ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства России
390000, Россия, г. Рязань, ул. Садовая, 33/2.
Тел./факс: 8 (920) 991-68-82.
E-mail: rudenko.evgenija@ya.ru

Address for correspondence:
Rudenko Evgenia A.
Federal State Institute for Advanced Skills, Federal Medical-Biological Agency of Russia
390000, Russian Federation, Ryazan, Sadovaya str., bldg 33, apt 2.
Phone/Fax: 7 (920) 991-68-82.
E-mail: rudenko.evgenija@ya.ru

Образец цитирования:
В.Г. Лихванцева, М.С. Афанасьев, Е.А. Руденко, А.В. Караулов, Е.В. Коростелева «Поиск тканей-мишеней в орбите для аутоиммунной агрессии тиреоидных антител при эндокринной офтальмопатии» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 557-566. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-557-566

© Лихванцева В.Г. и соавт., 2017

For citation:
V.G. Likhvantseva, M.S. Afanasiev, E.A. Rudenko, A.V. Karaulov, E.V. Korostelyova "Search for target tissue in the eye orbit for autoimmune aggression of thyroid antibodies in endocrine ophthalmopathy", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 557-566. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-557-566

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-557-566

SEARCH FOR TARGET TISSUE IN THE EYE ORBIT FOR AUTOIMMUNE AGGRESSION OF THYROID ANTIBODIES IN ENDOCRINE OPHTHALMOPATHY

Likhvantseva V.G.[a], Afanasiev M.S.[b], Rudenko E.A.[a], Karaulov A.V.[b], Korostelyova E.V.[a]

[a] *Federal State Institute for Advanced Skills, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation*

[b] *First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation*

Abstract. We searched for a possible target tissue in eye orbit for thyroid autoantibodies in endocrine ophthalmopathy (Graves' disease), using correlation analysis method. We examined a group of 139 patients (278 eye orbits) with thyroid-associated ophthalmopathy associated with diffuse toxic goiter. Serological parameters (antibodies to thyroid-stimulating hormone receptor; thyroglobulin, thyroid peroxidase) were compared with instrumental diagnostic data (multi-layer CT, ultrasonography of eye orbit, and exophthalmometer), as well as clinical symptoms. Statistical correlation analysis enabled us to show different degrees of association between thyroid antibodies and clinical manifestations of Graves' disease and eye orbit involvement.

Especially, carriers of antibodies to TSH receptor and thyroglobulin (as compared to seronegative patients) exhibited higher exophthalmos scores (19.16±0.26 mm, $p < 0.001$, and 19.41±0.40 mm, $p < 0.05$, respectively), and with total muscle index (2.42±0.05, $p < 0.01$, and 2.42±0.08, respectively). Meanwhile, eyelids in carriers of antibodies to TSH receptor and thyroid peroxidase proved to be more swollen ($p < 0.001$, $p < 0.05$, respectively). Carriage of antibodies to thyroglobulin was associated with synchronous involvement of two structures of the eye orbit: extraocular muscles and retrobulbar tissue, which is reflected by increase in the average ntegral exophthalmos index within the group.

Keywords: thyroid-associated ophthalmopathy, Graves' disease, thyroid antibodies, TSH receptor, thyroglobulin antibodies, thyroid peroxidase antibody, eye orbit, exophthalmos

Введение

Эндокринная офтальмопатия (ЭОП) – прогрессирующее аутоиммунное воспаление структур орбиты, ассоциированное с аутоиммунными заболеваниями щитовидной железы, проявляющееся патологическими изменениями орбитальных структур (ретробульбарная клетчатка, экстраокулярные мышцы, вовлечением зрительного нерва и роговицы), а также придаточного аппарата глаза (веки, конъюнктива, слезное мясцо и слезная железа) [1, 6]. В подавляющем большинстве случаев ЭОП развивается на фоне манифестировавшего диффузного токсического зоба или синхронно с ним [7, 12, 13].

Клиническая картина эндокринной офтальмопатии проявляется триадой симптомов: экзофтальмом, глазодвигательными нарушениями и отеком/утолщением век [8]. Экзофтальм обусловлен увеличением объема орбитальной структуры или нескольких структур, вовлеченных в аутоиммунный процесс: ретробульбарной клетчатки (РБК), экстраокулярных мышц (ЭОМ) либо одновременным вовлечением обеих структур. Глазодвигательные нарушения возникают вследствие аутоиммунного воспаления в тандеме с увеличением объема и изменением структуры экстраокулярных мышц, а отек/утолщение век – вследствие воспаления круговой мышцы века. В зависимости от вовлеченной в патологический процесс ткани-мишени (РБК/ЭОМ/РБК + ЭОМ/веки) выделяют клинико-рентгенологическую форму ЭОП: липогенная, миогенная, смешанная [1, 3]. Количество вовлеченных структур тесно связано с клиническими характеристиками заболевания: активностью и тяжестью. С другой стороны, установлено, что активность и тяжесть заболевания определяются амплитудой аутоиммунного воспаления орбиты и прямо коррелируют с аутоиммунным и тиреоидным статусом пациента.

Спектр АТ при аутоиммунной патологии щитовидной железы (ЩЖ) не ограничивается только АТ к рТТГ. От 50 до 70% больных ДТЗ являются носителями АТ к ТГ, которые не фиксируют комплемент и не обладают цитотоксичной активностью, и 50-80% пациентов с ДТЗ серопозитивны по АТ к тиреопероксидазе (АТ к ТПО). Эти АТ фиксируют комплемент и обладают цитотоксической активностью; они также тесно корре-

ТАБЛИЦА 1. ТИРЕОИДНЫЕ АНТИТЕЛА ВО ВЗАИМОСВЯЗИ С ЭКЗОФТАЛЬМОМ ПРИ ЭНДОКРИННОЙ ОФТАЛЬМОПАТИИ

TABLE 1. THYROID ANTIBODIES IN CONJUNCTION WITH EXOPHTHALMOS WITH ENDOCRINE OPHTHALMOPATHY

Вид антител Type of antibodies		**АТ-негативные пациенты** AT-negative patients	**АТ-позитивные пациенты** AT-positive patients	**Достоверность различий** Significance of differences
Данные экзофтальмометрии по Гертелю (мм) These exophthalmometer by Hertel (mm)				
АТ к ТПО Antibodies to thyroid peroxidase	**Интервал значений** Range of values	(n = 50) 12-24	(n = 108) 10-28	p = 0,3757, NS
	$M_{ср}$ = M±m	18,46±0,46	18,98±0,34	
АТ к рТТГ Antibodies to thyroid stimulating hormone (TSH) receptor	**Интервал значений** Range of values	(n = 60) 12-23	(n = 200) 10-30	p < 0,001
	$M_{ср}$ = M±m	17,06±0,35	19,16±0,26	
АТ к ТГ Antibodies to thyroglobulin	**Интервал значений** Range of values	(n = 72) 12-24	(n = 80) 12-27	p < 0,05
	$M_{ср}$ = M±m	18,15±0,32	19,41±0,40	
Данные протрузии глазного яблока по МСКТ (см) Data on eyeball protrusion shown by MSCT (cm)				
АТ к ТПО Antibodies to thyroid peroxidase	**Интервал значений** Range of values	(n = 44) 1,2-2,6	(n = 86) 1,3-2,9	p = 0,1725, NS
	$M_{ср}$ = M±m	1,96±0,05	2,04±0,04	
АТ к рТТГ Antibodies to thyroid stimulating hormone (TSH) receptor	**Интервал значений** Range of values	(n = 36) 1,5-2,6	(n = 142) 1,2-3,3	p = 0,7431, NS
	$M_{ср}$ = M±m	2,02±0,06	2,04±0,03	
АТ к ТГ Antibodies to thyroglobulin	**Интервал значений** Range of values	(n = 62) 1,2-2,6	(n = 62) 1,3-2,9	p < 0,1
	$M_{ср}$ = M±m	1,97±0,04	2,07±0,04	

лируют с гистологической картиной и степенью лимфоидной инфильтрации ЩЖ при БГ. В исследованиях В.Г. Лихванцевой и соавт. выявлена положительная корреляционная связь между АТ к рТТГ и активностью и тяжестью заболевания [5], а также связь АТ к ТПО и тяжестью ЭОП, что позволяет причислить АТ к ТПО – к факторам риска, способствующим повышению тяжести аутоиммунного воспаления в орбите при ЭОП [4]. При этом отсутствует анализ причин этой связи. В связи с чем методом корреляционного анализа между количественными показателями тиреоидных аутоантител и клинико-рентгенологическими параметрами ЭОМ и РБК мы попытались «вычислить» их возможные мишени в орбите. В перспективе это позволяло выйти на прогноз формы и исход заболевания.

Цель исследования – поиск тканей-мишеней тиреоидных антител для аутоиммунной агрессии в орбите при эндокринной офтальмопатии.

Материалы и методы

В исследование вошли 139 больных (278 орбит) с впервые выявленной ЭОП, ассоциированной с диффузным токсическим зобом (ДТЗ). На протяжении 1 года пациентов наблюдали офтальмолог и эндокринолог, осматривая каждые 3 месяца со дня первичного визита.

ДТЗ диагностировал эндокринолог на основании анамнеза, данных осмотра, уровня тиреоидных гормонов ($свT_4$, $свT_3$), тиреотропного гормона (ТТГ), показателей антител к рецептору ТТГ (АТ к рТТГ), а также эхографии щитовидной железы. Дополнительно определяли количествен-

ТАБЛИЦА 2. СРЕДНЕГРУППОВЫЕ ИНТЕГРАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ СУММАРНОГО МЫШЕЧНОГО ИНДЕКСА ПО ДАННЫМ МСКТ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ФАКТА НОСИТЕЛЬСТВА ТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ

TABLE 2. MEDIANE FOR A TOTAL MUSCLE PERFORMANCE INDEX BASED ON MSCT DEPENDENT ON CARRIAGE OF THYROID ANTIBODIES

Срок наблюдения Observation period **Ia (-)**		**АТ к рТТГ** Antibodies to thyroid stimulating hormone receptor		**АТ к ТГ** Antibodies to thyroglobulin		**АТ к ТПО** Antibodies to thyroid peroxidase	
		Ib (+)	**IIa (-)**	**IIb (+)**	**IIIa (-)**	**IIIb (+)**	
Первично Initially	**Диапазон** Range of values $M_{ср}$ = M±m	(n = 36) 1,86-4,62; 2,62±0,1	(n = 146) 1,33-5,50; 2,62±0,06	(n = 64) 1,33-4,62; 2,54±0,07	(n = 64) 1,39-4,55; 2,52±0,08	(n = 46) 1,75-4,62; 2,70±0,08**	(n = 86) 1,33-4,55; 2,47±0,06
12 мес. 12 months	**Диапазон** Range of values $M_{ср}$ = M±m	(n = 16) 1,50-3,07; 2,35±0,11	(n = 34) 1,44-4,99; 2,39±0,14	(n = 34) 1,44-3,51; 2,29±0,09	(n = 10) 2,01-2,67; 2,35±0,07	(n = 20) 1,75-3,51; 2,45±0,12*	(n = 26) 1,44-3,05; 2,18±0,08

Примечание. Достоверность различий внутри группы: ** – $p < 0,05$; * – $p < 0,1$.

Note. Differences within the group are significance by: **, $p < 0.05$; *, $p < 0.1$.

ные показатели антител к тиреопероксидазе (АТ к ТПО) и антител к тиреоглобулину (АТ к ТГ).

Показатели тиреоидного аутоиммунитета исследовали первично, спустя 6 и 12 месяцев. Уровень АТ к ТПО и АТ к ТГ определяли с помощью анализатора ARCHITECT (Abbott, США, метод иммуно-хемилюминесцентного анализа). Референтные границы нормы для АТ к ТПО составляли: ≤ 35 МЕ/мл, для АТ к ТГ: ≤ 40 МЕ/мл. Уровень АТ к рТТГ определяли радиорецепторным методом с использованием свиного рТТГ (TPAK) на наборах Brahms (Германия). Границы нормы для определения АТ к рТТГ: ≤ 1,5 мЕд/л.

Эндокринную офтальмопатию (код МКБ – H06.2) верифицировали в соответствии со стандартом «Федеральных клинических рекомендаций по диагностике и лечению эндокринной офтальмопатии при аутоиммунной патологии щитовидной железы» [2]. При постановке диагноза ЭОП учитывали основные характеристики заболевания: тяжесть и активность. Тяжесть оценивали по классификации NOSPECS, выделяя легкую, среднюю и тяжелую степень заболевания [2]. Активность оценивали в баллах по шкале клинической активности CAS (Clinical Activity Score) [2]. При обследовании особое внимание

ТАБЛИЦА 3. СВЯЗЬ ТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РЕНТГЕНОВСКОЙ ПЛОТНОСТИ РЕТРОБУЛЬБАРНОЙ КЛЕТЧАТКИ (едН) ПО ДАННЫМ МСКТ

TABLE 3. RELATIONSHIP BETWEEN THYROID ANTIBODIES AND X-RAY DENSITY INDICES OF RETROBULBAR FAT (HU) ACCORDING TO MSCT DATA

Rg-плотность X-ray density	**АТ к рТТГ** Antibodies to thyroid stimulating hormone receptor		**АТ к ТГ** Antibodies to thyroglobulin		**АТ к ТПО** Antibodies to thyroid peroxidase	
	Ia (-)	**Ib (+)**	**IIa (-)**	**IIb (+)**	**IIIa (-)**	**IIIb (+)**
min	-96,20±2,10	-97,83±1,09	-94,30±1,55*	-98,32±1,77	-4,97±1,78	-97,76±1,45
max	-47,57±3,56	-50,60±2,15	-46,90±3,15	-50,76±3,67	-46,99±3,60	-51,87±2,76

Примечание. Достоверность различий внутри группы: * – $p < 0,05$.

Note. Differences within the groups are significant by *, $p < 0.05$.

ТАБЛИЦА 4. СВЯЗЬ ТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ С ПОКАЗАТЕЛЯМИ РЕНТГЕНОВСКОЙ ПЛОТНОСТИ ГЛАЗОДВИГАТЕЛЬНЫХ МЫШЦ ПО МСКТ ДАННЫМ

TABLE 4. RELATIONSHIPS BETWEEN THYROID ANTIBODIES BASED ON INDICES OF X-RAY DENSITY OF EYE MUSCLES MSCT

Rg-плотность X-ray density	**АТ к рТТГ** Antibodies to thyroid stimulating hormone (TSH) receptor		**АТ к ТГ** Antibodies to thyroglobulin		**АТ к ТПО** Antibodies to thyroid peroxidase	
	Ia (-)	**Ib (+)**	**IIa (-)**	**IIb (+)**	**IIIa (-)**	**IIIb (+)**
Верхняя прямая мышца (ВПМ) M. rectus superior						
min	16,32±2,77	15,54±1,06	20,75±1,22**	16,19±1,46	20,05±1,62	18,2±1,18
max	50,74±2,96	45,69±0,87	45,55±1,83	49,57±1,68	50,08±2,00	46,35±1,47
Нижняя прямая мышца (НПМ) M. rectus inferior						
min	8,88±2,78	7,50±1,44	12,41±1,97**	5,79±2,09	12,55±1,98*	7,73±1,84
max	50,91±2,71*	45,37±1,04	50,14±1,81***	43,33±1,66	49,63±2,09	45,58±1,47
Латеральная прямая мышца (ЛПМ) M. rectus lateralis						
min	10,26±2,55	13,66±0,99	17,07±1,52*	13,02±1,58	15,8±1,84	14,06±1,33
max	50,29±2,32***	43,65±1,06	46,78±1,97	44,81±1,46	48,65±1,59**	44,26±1,50
Медиальная прямая мышца (МПМ) M. rectus medialis						
min	18,26±2,32	17,59±0,91	21,09±1,40*	16,86±1,44	19,43±1,73	18,05±1,14
max	55,55±2,37*	49,20±0,91	54,32±1,92*	49,22±1,44	53,45±1,96	50,30±1,38

Примечание. Достоверность различий внутри группы: * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,05$; * – $p < 0,01$.**

Note. The differences within the group are significance by *, $p < 0.1$; **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.01$.

уделяли экзофтальмометрии по Гертелю; оценке объема глазодвигательных нарушений по 9 направлениям, анализу диплопии по шкале Гормана (0 баллов – нет диплопии; 1 балл – возникает периодически, т.е. при взгляде прямо только при усталости или пробуждении; 2 – непостоянная, только при взгляде в одну сторону; 3 – постоянная, сохраняемая в исходном положении и при чтении, но корригируется, 4 – постоянная и не корригируется); отекам век (верхнее и нижнее веко оценивали раздельно по балльной системе). Структуры орбиты визуализировали с помощью УЗИ и мультиспиральной компьютерной томографии орбит (МСКТ, толщина среза 0,5 мм). Протокол МСКТ включал измерение протрузии глазного яблока, размеров орбиты, плотности РБК, размеров и плотности ЭОМ в различных плоскостях сканирования.

Клинические симптомы и данные инструментального обследования (МСКТ) анализировали для каждого глаза и орбиты.

В зависимости от анализируемого типа тиреоидных антител, пациентов распределяли на три основные группы с двумя подгруппами в каждой группе:

– I группа – подгруппа серонегативных (Ia) и серопозитивных (Ib) лиц по АТ к рТТГ (130 пациентов / 260 орбиты);

ТАБЛИЦА 5. СВЯЗЬ ТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ С РАЗМЕРАМИ ЭКСТРАОКУЛЯРНЫХ МЫШЦ ПО ЭХОГРАФИЧЕСКИМ И МСКТ ДАННЫМ

TABLE 5. RELATIONSHIP BETWEEN THYROID ANTIBODIES AND SIZE OF EXTRAOCULAR MUSCLES ON SONOGRAPHIC AND MSCT DATA

Вид исследования Type of study	**АТ к рТТГ** Antibodies to thyroid stimulating hormone (TSH) receptor		**АТ к ТГ** Antibodies to thyroglobulin		**АТ к ТПО** Antibodies to thyroid peroxidase	
	Ia (-)	**Ib (+)**	**IIa (-)**	**II b (+)**	**IIIa (-)**	**IIIb (+)**
Верхняя прямая мышца (ВПМ) M. rectus superior						
МСКТ MSCT	0,49±0,03*	0,54±0,02	0,53±0,03**	0,61±0,02	0,56±0,02	0,57±0,02
УЗИ Sonography	0,49±0,02****	0,63±0,02	0,64±0,04	0,59±0,02	0,65±0,05	0,59±0,02
Нижняя прямая мышца (НПМ) M. rectus inferior						
МСКТ MSCT	0,57±0,04	0,63±0,02	0,62±0,03*	0,70±0,03	0,60±0,03*	0,68±0,02
УЗИ Sonography	0,57±0,03*	0,63±0,02	0,56±0,04*	0,63±0,02	0,58±0,05	0,62±0,02
Латеральная прямая мышца (ЛПМ) M. rectus lateralis						
МСКТ MSCT	0,70±0,02**	0,82±0,04	0,72±0,03	0,64±0,03	0,81±0,04****	0,62±0,03
УЗИ Sonography	0,45±0,02****	0,55±0,02	0,50±0,03	0,55±0,02	0,52±0,03	0,53±0,02
Медиальная прямая мышца (МПМ) M. rectus medialis						
МСКТ MSCT	0,82±0,04	0,81±0,03	0,77±0,04	0,72±0,04	0,86±0,04***	0,70±0,03
УЗИ Sonography	0,63±0,02	0,58±0,03	0,59±0,03	0,63±0,03	0,60±0,04	0,64±0,02
Суммарный мышечный индекс (СМИ) The total index of muscle						
МСКТ MSCT	2,62±0,10	2,62±0,06	2,54±0,07	2,52±0,08	2,70±0,08**	2,47±0,06
УЗИ Sonography	2,07±0,09***	2,42±0,05	2,30±0,11	2,42±0,08	2,34±0,15	2,40±0,07

Примечание. Достоверность различий внутри группы * – $p < 0,1$; ** – $p < 0,05$; * – $p < 0,01$; **** – $p < 0,001$.**

Note. Differences within the group are significant by *, $p < 0.1$; **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.01$; ****, $p < 0.001$.

– II группа – подгруппа серонегативных (IIa) и серопозитивных (IIb) лиц по АТ к ТГ (76 пациента / 152 орбиты);

– III группа – подгруппа серонегативных (IIIa) и серопозитивных (IIIb) лиц по АТ к ТПО (79 пациентов / 158 орбит).

Серонегативными считали больных, у которых показатели антител укладывались в коридор нормы, серопозитивными – лиц с уровнем АТ выше нормы.

Результаты исследования анализировали с помощью пакета прикладных статистических программ SAS (Statistical Analysis System, SAS Institute Inc., США) и стандартных алгоритмов вариационной статистики, включая корреляционный анализ, анализ сопряженности, а также

ТАБЛИЦА 6. СВЯЗЬ ТИРЕОИДНЫХ АНТИТЕЛ С ИНТЕНСИВНОСТЬЮ ОТЕКОВ ВЕК (M±m, В БАЛЛАХ)

TABLE 6. COMMUNICATIONS BETWEEN THYROID ANTIBODIES AND INTENSE SWELLING OF EYELIDS (M±m, IN POINTS)

Вид АТ Type of antibody	**Отек века** Eyelid swelling	**Серонегативные пациенты** Seronegative patients	**Серопозитивные пациенты** Seropositive patients	**Достоверность различий, p** Significance of differences, p
АТ к рТТГ Antibodies to thyroid stimulating hormone (TSH) receptor	**Верхнее веко** Upper eyelid	0,57±0,07	1,01±0,04	p < 0,001
	Нижнее веко Lower eyelid	0,26±0,07	0,59±0,05	p < 0,001
АТ к ТГ Antibodies to thyroglobulin	**Верхнее веко** Upper eyelid	0,88±0,06	0,85±0,06	p = 0,7604, н/д
	Нижнее веко Lower eyelid	0,53±0,07	0,55±0,06	p = 0,8163, н/д
АТ к ТПО Antibodies to thyroid peroxidase	**Верхнее веко** Upper eyelid	0,80±0,08	0,93±0,05	p = 0,1348, н/д
	Нижнее веко Lower eyelid	0,38±0,09	0,62±0,06	p < 0,05

различные типы межгруппового сравнения распределений изучаемых показателей.

Результаты

Было установлено, что серопозитивные пациенты по АТ к ТГ или АТ к рТТГ на этапе манифестации ЭОП имели более выраженный экзофтальм, по сравнению с серонегативными лицами (табл. 1).

Известно, что величина экзофтальма при ЭОП зависит от объема и спектра конкретных структур, вовлеченных в патологический процесс. Он может быть обусловлен увеличением объема только РБК (липогенная форма) или только ЭОМ (миогенная форма), но также могут быть увеличены объемы как ЭОМ, так и РБК (смешанная форма). Поэтому мы проанализировали среднегрупповые интегральные показатели суммарного мышечного индекса (СМИ) в зависимости от типа носительства тиреоидных антител (табл. 2).

Статистически и клинически значимая разница СМИ была обнаружена только между серопозитивными и серонегативными лицами по АТ к ТПО.

Анализ данных МСКТ позволил выявить некоторые различия на уровне рентгеновской плотности РБК (табл. 3).

У серонегативных пациентов по АТ к ТГ оказались достоверно ниже минимальная и максимальная плотность РБК (p < 0,05, н/д, соответственно) по данным МСКТ. Это указывало на более выраженный отек РБК у носителей АТ к ТГ и объясняло причины более высокого экзофтальма в их группе.

Уровень АТ к рТТГ прямо коррелировал с экзофтальмом по Гертелю: линейный коэффициент корреляции по Пирсону r = 0,24849 (p < 0,001).

Мы проанализировали у лиц-носителей тиреоидных аутоАТ «вклад» глазодвигательных мышц в экзофтальм по МСКТ-данным (табл. 4). Как видно из представленной таблицы 4, носительство АТ к ТГ у больных ЭОП прямо коррелировало с минимальной рентгеновской плотностью ЭОМ. Это особенно наглядно демонстрирует НПМ и ВПМ (p < 0,05), наиболее часто вовлекаемые в процесс.

Кроме того, у носителей АТ к ТГ шире оказались размеры ВПМ (p < 0,05) и НПМ в сагиттальной проекции (p < 0,1).

Факт носительства АТ к рТТГ коррелировал с максимальной рентгеновской плотностью ЭОМ и их размерами. В частности, клинически значимой оказалась разница среднегрупповых показателей максимальной рентгеновской плотности серопозитивных и серонегативных лиц по ЛПМ (p < 0,01), НПМ и МПМ (p < 0,1). Кроме того, у носителей АТ к рТТГ были шире размеры НПМ (p < 0,1), ВПМ и ЛПМ (p < 0,01) по УЗИ-данным (табл. 5). Коррелятивную связь с размерами подтверждал суммарный мышечный индекс по УЗ-данным: коэффициент корреляции между СМИ и уровнем АТ к рТТГ составил: r = 0,30372 (p < 0,01).

Обратная коррелятивная связь выявлена между фактом носительства АТ к ТПО и вовлечением ЭОМ. У носителей АТ к ТПО была достоверно ниже максимальная рентгеновская плотность ЛПМ ($p < 0,05$) и меньше размеры ЭОМ: латеральной прямой ($p < 0,001$) и медиальной прямой мышц ($p < 0,01$). Соответственно, их СМИ оказался достоверно ниже ($p < 0,05$) (табл. 5).

Тесная прямая коррелятивная связь была обнаружена между фактом носительства АТ к ТПО, АТ к рТТГ и отеком век. Больные ЭОП серопозитивные по АТ к рТТГ ($p < 0,001$) и в меньшей степени носители АТ к ТПО ($p < 0,05$) отличались более выраженными отеками век (табл. 6).

Обсуждение

Согласно одной из существующих теорий, аутоиммунное воспаление в орбите запускают перекрестные цитотоксические реакции с участием антител к антигенам (АГ) щитовидной железы. Тиреоидные антитела направлены против тканей-мишеней орбиты, экспрессирующих клеточные или мембранные аутоантигены, сходные или даже идентичные тиреоидным АГ или рецептору ТТГ [9]. В качестве положительных аргументов приверженцы этой теории приводят частое сочетание двух АИЗ (ДТЗ и ЭОП) [9], синхронную манифестацию ЭОП и ДТЗ в подавляющем (90%) большинстве случаев, спонтанные ремиссии офтальмопатии при достижении эутиреоза и нормализации уровня тиреоидных антител в периферическом кровотоке. В связи с этим ЭОП признана «золотым» маркером диагностики ДТЗ и дифференциальной диагностики тиреоидной патологии [3]. Негативными аргументами служат отсутствие единства мнений относительно ключевого АГ, осуществляющего запуск патогенеза ЭОП, отсутствие убедительных морфологических данных, подтверждающих присутствие заявленных перекрестных АГ на тканях-мишенях в орбите; отсутствие экспериментальных доказательств, подтверждающих участие тиреоидных АГ в запуске ЭОП, присутствие тиреоидных и рецепторных АТ в норме и при заболеваниях щитовидной железы в отсутствие клиники ЭОП. На роль ключевого АГ при ЭОП выдвигались поочередно: то тиреоглобулин, то тиреопероксидаза, то рТТГ. В качестве доказательной базы участия АТ к этим антигенам в патогенезе АИЗ рассматривали классические экспертные признаки: повышенную частоту выявления у больных ЭОП персистирующих аутоантител, претендующих на ключевую роль, доказательства прямой связи уровня этих антител с амплитудой воспаления или выраженностью клинических признаков заболевания орбиты; развитие модели аутоиммунного заболевания орбиты путем пассивного переноса сенсибилизирующих аутоАТ экспериментальным животным (постулат Коуэна, Мак-Кларки).

Одной из первых гипотез патогенеза ЭОП была теория J.P. Kriss, сформулированная в начале 1970 г. Он постулировал, что патогенез ЭОП запускают депозиты тиреоглобулинов, отложившиеся в орбитальных тканях, за которой следует аутоиммунная реакция против ТГ. Полагали, что ТГ попадает в орбитальные ткани через шейные лимфатические сосуды из щитовидной железы и обнаруживается в РБК пациентов с ЭОП [10, 11, 12]. В последние 50 лет были проведены несколько исследований, проверяющих эту гипотезу. Получены результаты, как подтверждающие ее, так и опровергающие. Гистологически присутствие ТГ в орбитальных тканях верифицировано, что подтверждало гипотезу J.P. Kriss. Вместе с тем роль ТГ как значимого аутоАГ не подтверждена коррелляциями клиники с серологическими показателями АТ к ТГ. Кроме того, у мышей, иммунизированных ТГ, не развивалась модель эндокринной офтальмопатии. Таким образом, не объяснены истинные механизмы вовлечения ТГ в патогенез ЭОП. Авторы склонились к мысли, что АТ к ТГ не относятся к триггерным механизмам запуска заболевания, скорее, они усиливают или ухудшают поражение, индуцированное другими механизмами [11].

Проведенные нами исследования продемонстрировали ассоциативную связь разной силы между клинико-рентгенологическими проявлениями заболевания (экзофтальмом, отеком век, глазодвигательными нарушениями, спектром орбитальных структур, вовлеченных в патологический процесс) с одной стороны и типом тиреоидных антител, персистирующих в крови больного с другой. В частности, при высоких концентрациях в крови АТ к рТТГ и ТГ был выше экзофтальм, чаще и в большей степени поражались ЭОМ, у носителей АТ к рТТГ и ТПО сильнее отекали веки. У носителей АТ к ТГ синхронно поражались ЭОМ и РБК; вовлечение двух структур орбиты повышало среднегрупповые интегральные показатели экзофтальма в их группе.

Полагаем, что выявленная связь носит, скорее, опосредованный характер, чем прямой. На этапе манифестации ДТЗ и ЭОП доминирующей популяцией АТ у больных ДТЗ была популяция АТ к рТТГ. Их концентрация прямо коррелировала с интенсивностью отека век и экзофтальмом, вызванным вовлечением в патологический процесс

ЭОМ и увеличением их размеров. Но в первую очередь их концентрация отражала амплитуду аутоиммунных реакций заболевания щитовидной железы. Не удивительно, что интенсивному течению АИЗ щитовидной железы соответствует более агрессивное течение АИЗ орбиты, проявляющееся более высоким экзофтальмом и интенсивными отеками ЭОМ и век.

Антитела к ТПО и ТГ появлялись далеко не в первую очередь у больных ДТЗ. Их появление – свидетельство перехода в другую стадию эволюции АИЗ щитовидной железы, характеризующуюся расширением спектра и активности тиреоидных антител, а также увеличением количества активных клонов В-лимфоцитов, продуцирующих эти антитела. На этом фоне вовлечение в патологический процесс орбиты у носителей АТ к ТГ ретробульбарной клетчатки, а у носителей АТ к ТПО – усиление отека век, вполне закономерно.

Как бы то ни было в реалиях, наши данные позволяют сделать следующие выводы:

1. Носительство АТ к рТТГ ассоциируется с вовлечением ЭОМ и век, в то время как носительство АТ к ТГ – с одновременным вовлечением двух структур орбиты (ЭОМ и РБК), повышением степени выстояния глазного яблока в орбите (экзофтальма), носительство АТ к ТПО – с повышением интенсивности отека век.

2. Выявленная ассоциативная связь тиреоидных антител с их орбитальной мишенью раскрывает возможности прогнозирования клинико-рентгенологической формы (липогенная, миогенная, смешанная) ЭОП и показанием для их тестирования в крови больных ЭОП.

Список литературы / References

1. Бровкина А.Ф. Эндокринная офтальмопатия. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. 176 с. [Brovkina A.F. Endocrine ophthalmopathy]. Moscow: GEOTAR-Media, 2008. 176 p.

2. Дедов И.И., Мельниченко Г.А., Свириденко Н.Ю., Трошина Е.А., Фадеев В.В., Беловалова И.М., Шеремета М.С., Румянцева П.О., Петунина Н.А., Гринева Е.Н., Стронгин Л.Г., Нероев В.В., Катаргина Л.А., Саакян С.В., Пантелеева О.Г., Вальский В.В., Бровкина А.Ф., Атарщиков Д.С., Бессмертная Е.Г., Липатов Д.В., Астахов Ю.С., Сейдашева Э.И., Золотарев А.В., Догадова Л.И. Федеральные клинические рекомендации по диагностике и лечению эндокринной офтальмопатии // Проблемы эндокринологии, 2015. № 1. С. 61-74. [Dedov I.I., Melnichenko G.A., Sviridenko N.Yu., Troshina E.A., Fadeev V.V., Belovalova I.M., Sheremeta M.S., Rumyantseva P.O., Petunina N.A., Grineva E.N., Strongin L.G., Neroev V.V., Katargina L.A., Saakyan S.V., Panteleeva O.G., Valskiy V.V., Brovkina A.F., Atarshhikov D.S., Bessmertnaya E.G., Lipatov D.V., Astahov Yu.S., Seydasheva E.I., Zolotarev A.V., Dogadova L.I. The federal guidelines for the diagnosis and treatment of endocrine ophthalmopathy]. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology, 2015, no. 1, pp. 61-74.* (In Russ.)]

3. Дедов И.И., Мельниченко Г.А. Болезнь Грейвса и эндокринная офтальмопатия. М.: МАИ-ПРИНТ, 2012. 144 с. [Dedov I.I., Melnichenko G.A. Graves' disease and endocrine ophthalmopathy]. Moscow: MAI-PRINT, 2012. 144 p.

4. Лихванцева В.Г., Свириденко Н.Ю., Руденко Е.А., Гонтюрова О.А., Выгодин В.А. Особенности клинических проявлений эндокринной офтальмопатии у пациентов-носителей аутоантител к тиреопероксидазе // Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова, 2011. № 3. С. 69-74. [Likhvantseva V.G., Sviridenko N.Yu., Rudenko E.A., Gontyurova O.A., Vygodin V.A. Features of clinical manifestations of endocrine ophthalmopathy in patients carriers of autoantibodies to thyroid peroxidase]. *Rossiyskiy mediko-biologicheskiy vestnik imeni akademika I.P. Pavlova = Russian Medical and Biological Messenger named after academician I.P. Pavlov, 2011, no. 3, pp. 69-74.* (In Russ.)]

5. Свириденко Н.Ю., Лихванцева В.Г., Беловалова И.М., Шеремета М.С., Табеева К.И. Антитела к рецептору ТТГ как предикторы тяжести и исходов эндокринной офтальмопатии у пациентов с болезнью Грейвса // Проблемы эндокринологии, 2009. № 2. С. 19-22. [Sviridenko N.Yu., Likhvantseva V.G., Belovalova I.M., Sheremeta M.S., Tabeeva K.I. Antibodies against TSH receptor as predictors of severity and outcome of endocrine ophthalmopathy in patients with Graves' disease]. *Problemy endokrinologii = Problems of Endocrinology, 2009, no. 2, pp. 19-22.* (In Russ.)]

6. Badelon I., Mora S. Graves' ophthalmopathy. *Rev. Prat., 2005, Vol. 55, no. 2, pp. 183-186.*

7. Burch H.B., Wartofsky L. Graves' ophthalmopathy: current concepts regarding pathogenesis and management. *Endocrine Reviews, 1993, Vol. 14, no. 6, pp. 747-793.*

8. Pinchera A., Wiersinga W., Glinoer D., Kendall-Taylor P., Koorneef L., Marcocci C. Classification of eye changes of Graves' disease. *Thyroid, 1992, Vol. 2, pp. 235-236.*

9. Naya M. Gracia, Uson M., Lopez- Lopez A.. Thyroid ophthalmopathy-ad a unique clinical manifestation of thyrotoxicosis. *Rev. Neurol., 1995, Vol. 23, no. 123, pp. 1059-1062.*

10. Noth D., Gebauer G., Muller B. Graves' ophthalmopathy: natural history and treatment outcomes. *Swiss Med. Weekly, 2001, Vol. 131, pp. 603-609.*

11. Role of thyroglobulin in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy: the hypothesis of Kriss revisited. *J. Endocrinol. Invest., 2004, Vol. 27, no. 3, pp. 230-236.*

12. Wiersinga W.M. Pathogenesis of Graves' Ophthalmopathy – Current Understanding. *J. Clin. Endocrinol. Metab., 2001, Vol. 86, no. 2, pp. 501-503.*

13. Wiersinga W.M., Smit T., van der Gaag R., Koomneef L. Temporal relationship between onset of Graves' ophthalmopathy and onset of thyroidal Graves' disease. *J. Endocrinol. Invest., 1988, Vol. 11, pp. 615-619.*

Авторы:

Лихванцева В.Г. *– д.м.н., профессор, профессор кафедры глазных болезней ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия*

Афанасьев М.С. *– д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Руденко Е.А. *– соискатель кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия*

Караулов А.В. *– д.м.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой клинической иммунологии и аллергологии ФГБОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Коростелева Е.В. *– соискатель кафедры офтальмологии ФГБОУ ДПО «Институт повышения квалификации» Федерального медико-биологического агентства России, Москва, Россия*

Authors:

Likhvantseva V.G.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Ophthalmology, Federal State Institute for Advanced Skills, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation*

Afanasiev M.S.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology and Allergology, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation*

Rudenko E.A.*, Postdoctoral Fellow, Department of Ophthalmology, Federal State Institute for Advanced Skills, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation*

Karaulov A.V.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Full Member, Russian Academy of Sciences, Head, Department of Clinical Immunology and Allergology, First Moscow State I.M. Sechenov Medical University, Moscow, Russian Federation*

Korostelyova E.V.*, Postdoctoral Fellow, Department of Ophthalmology, Federal State Institute for Advanced Skills, Federal Medical-Biological Agency of Russia, Moscow, Russian Federation*

Поступила 23.01.2017
Отправлена на доработку 09.02.2017
Принята к печати 27.02.2017

Received 23.01.2017
Revision received 09.02.2017
Accepted 27.02.2017

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА ПРОДУКЦИИ ЦИТОКИНОВ ИММУНОКОМПЕТЕНТНЫМИ КЛЕТКАМИ КРОВИ И ОПУХОЛИ В РАЗЛИЧНЫХ ВОЗРАСТНЫХ ГРУППАХ БОЛЬНЫХ ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Кунц Т.А.[1], Михайлова Е.С.[1, 2], Маринкин И.О.[1], Вараксин Н.А.[3], Аутеншлюс А.И.[1, 2]

[1] ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия
[2] ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск, Россия
[3] АО «Вектор-Бест», Новосибирская область, Россия

Резюме. Известно, что существует взаимосвязь между возрастом пациента и патогенезом злокачественных новообразований, который сопряжен со способностью клеток опухоли и ее микроокружения секретировать цитокины, играющие значительную роль в канцерогенезе. Целью исследования явился сравнительный анализ продукции цитокинов клетками периферической крови и опухоли при воздействии на них поликлональных активаторов (ПА) при инвазивном протоковом раке молочной железы в различных возрастных группах больных. Материалом исследования служили образцы периферической крови и опухоли 54 женщин с инвазивным протоковым раком, являющимся по гистологическому типу аденокарциномой. Пациенты были разделены на группы по возрасту: I гр. – 40-60 лет, II гр. – 61 и более. В группе I метастазы в лимфатических узлах на момент исследования были выявлены у 13 пациентов из 31 (42%), в отличие от группы II, где количество пациентов с метастазами составило всего 3 человека из 23 (10%). Определение критерия Фишера показало достоверные различия между встречаемостью на момент исследования лимфоузлов с метастазами в зависимости от возраста пациентов ($p = 0,034$). В обеих возрастных группах пациентов отмечалось повышение концентрации IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1ra, G-CSF, GM-CSF и VEGF в супернатанте клеток опухоли и ее микроокружения по сравнению с продукцией цитокинов клетками крови, что свидетельствовало о высокой функциональной активности новообразования в совокупности с его микроокружением. Добавление ПА в среду культивирования приводило к повышению концентраций IL-2, IL-10, IL-17, IL-1β, IL-1ra, TNFα и IFNγ в супернатанте клеток крови, что свидетельствовало об их высоком потенциале в отношении их секреции. В группе пациентов в возрасте 40-60 лет индекс влияния ПА на продукцию IFNγ в несколько раз превышал аналогичный показатель у больных в возрасте 61 и более лет. Повышение ИВПА на продукцию практически всех цитокинов в супернатанте крови по сравнению с показателями супернатанта опухоли можно объяснить изначально высокими уровнями спонтанной продукции цитокинов опухолью и ее микроокружением, обеспечивающими злокачественную прогрессию, поэтому действие ПА на опухоль не приводило к такому же эффекту, как при действии на иммунокомпетентные клетки крови. Единственным цитокином, к продукции которого клетки

Адрес для переписки:
Кунц Татьяна Анатольевна
ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ
630091, Россия, г. Новосибирск, Красный пр., 52.
Тел./факс: 8 (383) 226-35-60.
E-mail: tkunts@ngs.ru

Address for correspondence:
Kunts Tatyana A.
Novosibirsk State Medical University
630091, Russian Federation, Novosibirsk, Krasny ave, 52.
Phone/Fax: 7 (383) 226-35-60.
E-mail: tkunts@ngs.ru

Образец цитирования:
Т.А. Кунц, Е.С. Михайлова, И.О. Маринкин, Н.А. Вараксин, А.И. Аутеншлюс «Сравнительная оценка продукции цитокинов иммунокомпетентными клетками крови и опухоли в различных возрастных группах больных инвазивным протоковым раком молочной железы» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 567-576. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-567-576

© Кунц Т.А. и соавт., 2017

For citation:
T.A. Kunts, E.S. Mikhaylova, I.O. Marinkin, N.A. Varaksin, A.I. Autenshlyus "Comparative analysis of cytokine production by blood immunocompetent cells and tumor in different age groups of patients with invasive ductal carcinoma", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 567-576.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-567-576

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-567-576

опухоли и микроокружения сохраняли высокий потенциал, был IL-18, что подтверждает его важную роль в канцерогенезе. На основании полученных данных о влиянии поликлональных активаторов на цитокинпродуцирующую функцию клеток опухоли и крови можно прийти к выводу о том, что постоянно циркулирующие иммунокомпетентные клетки, обладая высокой способностью к секреции цитокинов, являются тем резервом, который обеспечивает опухолевую прогрессию.

Ключевые слова: цитокины, супернатант, поликлональные активаторы, рак молочной железы

COMPARATIVE ANALYSIS OF CYTOKINE PRODUCTION BY BLOOD IMMUNOCOMPETENT CELLS AND TUMOR IN DIFFERENT AGE GROUPS OF PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA

Kunts T.A.[a], Mikhaylova E.S.[a, b], Marinkin I.O.[a], Varaksin N.A.[c], Autenshlyus A.I.[a, b]

[a] *Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*
[b] *Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation*
[c] *JSC "Vector-Best", Novosibirsk Region, Russian Federation*

Abstract. It is known that a relationship exists between patient's age and pathogenesis of malignant tumors associated with ability of tumor and its microenvironment to secrete cytokines that may play an important role in carcinogenesis. The aim of present study was a comparative analysis of cytokine production by peripheral blood cells and tumor samples when exposed to polyclonal activators (PA) in patients of different age groups with invasive ductal carcinoma. Peripheral blood samples of 54 women with invasive ductal carcinoma were under study. The patients were divided into the following groups: I, 40-60 years old; II, 61 year and older. Metastases into lymph nodes were revealed at the moment of study in 13 patients (42%) from group I. By contrast, only 3 of 23 (10%) patients with metastases were revealed in group II. Fisher's ratio test showed significant differences between occurrence of metastases in lymph nodes, and patient age ($p = 0.034$). In both groups of patients, there was an increase of IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1ra, G-CSF, GM-CSF and VEGF concentrations in tumor supernates and its microenvironment, when compared with the production of cytokines by blood cells, thus indicating to high functional activity of tumor together with its microenvironment. Effect of PA led to increase of IL-2, IL-10, IL-17, IL-1β, IL-1ra, TNFα and IFNγ concentrations in blood cells supernatant which suggested their high ability to produce cytokines. In the group of patients who were 40-60 years old, the stimulatory index of PA (SIPA) for IFNγ production was several times higher than similar index in patients aged 61 years or more. Increase of SIPA for all cytokines in blood cells supernates, in comparison to SIPA of tumor supernates, could be explained by initially high levels of spontaneous cytokine production by the tumor and its microenvironment that are able to promote tumor growth. Therefore, effect of PA upon tumor tissue was not so expressed as its effect upon immunocompetent blood cells. Both tumor and microenvironment maintained high ability of IL-18 production, thus confirming its important role in carcinogenesis. In summary, these findings suggest that circulating immunocompetent cells may serve as an additional factor providing tumor progression, due to their high ability to secrete cytokines.

Keywords: cytokines, supernatant, polyclonal activators, breast cancer

Введение

Цитокины, в силу своих свойств, способны прямо или косвенно влиять на дифференцировку и апоптоз опухолевых клеток, стимулировать ангиогенез, тем самым обеспечивая рост и прогрессию опухоли [10, 21, 23]. Являясь центральными регуляторами иммунного гомеостаза, цитокины, продуцируемые иммунокомпетентными клетками, связаны с процессами, протекающими локально в самом злокачественном новообразовании. Состав микроокружения опухоли достаточно разнообразен: хотя основная часть и представлена иммунокомпетентными клетками, помимо них в него входят эндотелиальные клетки, фибробласты, фиброциты, незрелые дендритные, тучные клетки, которые также являются продуцентами цитокинов [5]. Известно, что возраст пациентов сопряжен с характером течения опухолевого процесса, в частности с метастазированием, как это было показано при раке молочной железы [2, 29].

Целью настоящего исследования явился сравнительный анализ продукции цитокинов

клетками периферической крови, опухоли ее микроокружения при воздействии на них поликлональных активаторов при инвазивном протоковом раке молочной железы в различных возрастных группах больных.

Материалы и методы

Материалом исследования служили образцы периферической кров и и опухоли 54 женщин с инвазивным протоковым раком, являющимся по гистологическому типу аденокарциномой. Пациенты были разделены на группы по возрасту: I гр. – 40-60 лет, II гр. – 61 и более. В группе I метастазы в лимфатических узлах на момент исследования были выявлены у 13 пациентов из 31 (42%), в отличие от группы II, где количество пациентов с метастазами составило всего 3 человека из 23 (10%). Определение критерия Фишера показало достоверные различия между встречаемостью на момент исследования лимфоузлов с метастазами в зависимости от возраста пациентов ($p = 0,034$).

Для оценки цитокинпродуцирующего потенциала ИКК крови, а также опухоли и ее микроокружения применяли комплекс поликлональных активаторов (ПА), состоящий из фитогемагглютинина в концентрации 4 мкг/мл, конканавалина А в концентрации 4 мкг/мл и липополисахарида в концентрации 2 мкг/мл. В исследовании использовали стандартизованный набор реагентов «Цитокин-стимул-бест» производства АО «Вектор-Бест». Одну часть клеток крови пациента инкубировали в питательной среде DMEM-F12 (для определения спонтанной продукции), а другую – в таком же объеме среды при 37 °С в течение 24 ч с комплексом ПА для определения индуцированной им продукции цитокинов, после чего клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин, получали супернатант, в котором проводили определение концентрации цитокинов [3].

Биоптаты опухолей объемом 8 мм^3, полученные методом трепанобиопсии, помещали в 2 флакона, в одном из которых находилась только питательная среда DMEM-F12 (спонтанная продукция), а в другом – раствор ПА в таком же объеме среды (продукция, индуцированная ПА) и инкубировали при 37 °С в течение 72 ч. Для получения супернатанта опухоль извлекали, а оставшиеся клетки осаждали центрифугированием при 2000 об/мин, 15 мин, после чего в супернатанте с помощью иммуноферментного анализа определяли концентрацию IL-2, IL-6, IL-8,

ТАБЛИЦА 1. СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ В ВОЗРАСТЕ 40-60 ЛЕТ

TABLE 1. SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TUMOR IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AGED 40-60 YEARS

Цитокин Cytokine	**Концентрация в супернатанте, пг/мл** Concentration the supernatant, pg/ml	
	Периферическая кровь Peripheral blood **n = 31**	**Опухоль и ее микроокружение** Tumor and microenvironment **n = 31**
	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	**Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)**
IL-2	2,00 (2,00; 2,00); p = 0,001	2,00 (2,00; 3,30)
IL-6	182,30 (111,00; 643,40); p = 0,0001	52440,00 (36300,00; 69740,00)
IL-8	675,00 (355,00; 2820,00); p = 0,0001	25000,00 (15840,00; 45460,00)
IL-10	2,20 (1,00; 5,80); p = 0,0001	11,20 (5,40; 18,30)
IL-17	2,00 (2,00; 2,00); p = 0,0001	2,20 (2,00; 5,20)
IL-18	24,60 (17,90; 30,40); p = 0,0001	108,70 (41,20; 251,30)
IL-1β	52,90 (15,60; 111,40)	49,60 (20,40; 86,00)
IL-1ra	644,40 (494,90; 936,10); p = 0,0001	9600,00 (1659,10; 36365,00)
TNFα	11,80 (5,70; 21,40)	10,50 (7,70; 22,60)
IFNγ	2,00 (2,00; 2,00); p = 0,0001	9,30 (7,20; 23,20)
G-CSF	13,10 (5,50; 42,50); p = 0,0001	2000,00 (606,70; 2850,50)
GM-CSF	3,80 (2,00; 9,40); p = 0,0001	43,00 (22,00; 79,50)
VEGF	53,80 (25,40; 89,30); p = 0,0001	2951,20 (2242,00; 4607,40)
MCP-1	3107,10 (1171,00; 7255,90)	3840,30 (1495,20; 10516,00)

ТАБЛИЦА 2. СПОНТАННАЯ ПРОДУКЦИЯ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ В ВОЗРАСТЕ 61-77 ЛЕТ

TABLE 2. SPONTANEOUS CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TUMOR IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AGED 61-77 YEARS

Цитокин Cytokine	**Концентрация в супернатанте, пг/мл** Concentration the supernatant, pg/ml	
	Периферическая кровь Peripheral blood **n = 23**	**Опухоль и ее микроокружение** Tumor and microenvironment **n = 23**
	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	**Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)**
IL-2	2,00 (2,00; 2,00)	2,00 (2,00; 2,70)
IL-6	140,00 (33,20; 657,40); p = 0,0001	41040,00 (21820,00; 46980,00)
IL-8	520,00 (265,00; 1875,00); p = 0,0001	24800,00 (10400,00; 28860,00)
IL-10	4,10 (1,70; 6,50); p = 0,002	11,30 (4,80; 17,50)
IL-17	2,00 (1,00; 2,00); p = 0,001	2,30 (2,00; 8,10)
IL-18	27,40 (21,70; 34,20); p = 0,0001	76,90 (47,50; 203,70)
IL-1β	40,00 (12,90; 98,00)	34,10 (19,90; 61,50)
IL-1ra	533,50 (447,60; 1159,90); p = 0,0001	8820,00 (3105,00; 15855,00)
TNFα	10,90 (2,80; 25,90)	12,80 (4,70; 22,80)
IFNγ	2,00 (2,00; 2,00); p = 0,0001	11,40 (6,90; 18,00)
G-CSF	12,90 (2,00; 39,70); p = 0,0001	2767,50 (621,00; 2947,50)
GM-CSF	2,00 (2,00; 7,10); p = 0,0001	21,20 (9,80; 60,50)
VEGF	45,40 (28,70; 76,60); p = 0,0001	2164,40 (1346,60; 3243,00)
MCP-1	2119,00 (1211,00; 6601,30)	2296,00 (1138,00; 7504,00)

ТАБЛИЦА 3. ВЛИЯНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ В ВОЗРАСТЕ 40-60 ЛЕТ

TABLE 3. POLYCLONAL ACTIVATORS EFFECT ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TUMOR IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AGED 40-60 YEARS

Цитокин Cytokine	**Концентрация в супернатанте, пг/мл** Concentration the supernatant, pg/ml	
	Периферическая кровь Peripheral blood **n = 31**	**Опухоль и ее микроокружение** Tumor and microenvironment **n = 31**
	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	**Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)**
IL-2	19,00 (11,80; 32,60); p = 0,0001	6,60 (3,00; 9,50)
IL-6	12750,00 (9700,00; 16300,00); p = 0,0001	110000,00 (60750,00; 165100,00)
IL-8	16550,00 (12300,00; 25950,00); p = 0,0001	41350,00 (22900,00; 75850,00)
IL-10	93,80 (62,40; 123,60); p = 0,0001	13,50 (4,00; 32,30)
IL-17	53,20 (24,30; 120,40); p = 0,0001	6,50 (3,10; 14,00)
IL-18	32,10 (25,10; 38,90); p = 0,0001	226,60 (101,00; 404,30)
IL-1β	1290,00 (935,00; 1815,00); p = 0,0001	600,00 (390,00; 855,00)
IL-1ra	8146,00 (6176,60; 12254,50); p = 0,0001	16779,70 (10755,00; 38225,00)
TNFα	813,10 (614,00; 1280,00); p = 0,0001	38,60 (17,70; 81,40)
IFNγ	1191,50 (488,70; 1511,20); p = 0,0001	36,50 (10,50; 64,50)
G-CSF	855,00 (536,6; 1037,20); p = 0,0001	2845,00 (1275,00; 2906,00)
GM-CSF	91,70 (48,20; 122,40); p = 0,019	125,60 (64,70; 243,70)
VEGF	106,00 (74,20; 163,10); p = 0,0001	1664,40 (864,80; 3392,00)
MCP-1	4633,60 (2849,00; 5863,90)	2742,00 (1896,00; 12756,00)

ТАБЛИЦА 4. ВЛИЯНИЕ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ В ВОЗРАСТЕ 61-77 ЛЕТ
TABLE 4. POLYCLONAL ACTIVATORS EFFECT ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TUMOR IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AGED 61-77 YEARS

Цитокин Cytokine	**Концентрация в супернатанте, пг/мл** Concentration the supernatant, pg/ml	
	Периферическая кровь Peripheral blood **n = 23**	**Опухоль и ее микроокружение** Tumor and microenvironment **n = 23**
	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	**Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)**
IL-2	15,10 (7,00; 32,00); p = 0,0001	3,90 (2,00; 12,00)
IL-6	11100,00 (8200,00; 18950,00); p = 0,0001	85900,00 (25550,00; 136350,00)
IL-8	15050,00 (11900,00; 19200,00)	38700,00 (10550,00; 57850,00)
IL-10	92,70 (56,00; 138,10); p = 0,0001	13,20 (3,60; 118,20)
IL-17	41,60 (18,90; 89,00); p = 0,0001	4,30 (2,00; 16,00)
IL-18	35,20 (27,20; 39,30); p = 0,0001	289,40 (86,90; 468,30)
IL-1β	1490,00 (1060,00; 3560,00); p = 0,0001	510,00 (265,00; 935,00)
IL-1ra	8600,00 (5071,40; 9365,50); p = 0,0001	16148,90 (11435,00; 27060,00)
TNFα	1174,00 (658,00; 1366,00); p = 0,0001	43,70 (14,80; 90,10)
IFNγ	619,30 (310,70; 1224,90); p = 0,0001	12,30 (8,30; 28,70)
G-CSF	760,60 (704,20; 1006,00); p = 0,0001	2832,50 (1333,00; 3485,50)
GM-CSF	63,70 (37,70; 129,30)	133,10 (53,50; 215,20)
VEGF	118,40 (84,20; 208,40); p = 0,0001	1810,80 (1034,60; 2398,00)
MCP-1	3820,00 (2735,00; 4236,00)	3357,00 (739,20; 10521,00)

ТАБЛИЦА 5. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ (ИВПА) НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ В ВОЗРАСТЕ 40-60 ЛЕТ
TABLE 5. STIMULATION INDEXES OF POLYCLONAL ACTIVATORS (SIPA) ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TUMOR IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AGED 40-60 YEARS

Цитокин Cytokine	**Концентрация в супернатанте, пг/мл** Concentration the supernatant, pg/ml	
	Периферическая кровь Peripheral blood **n = 31**	**Опухоль и ее микроокружение** Tumor and microenvironment **n = 31**
	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	**Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)**
IL-2	9,50 (5,90; 16,30); p = 0,0001	2,40 (1,00; 4,35)
IL-6	60,80 (18,10; 119,70); p = 0,0001	2,32 (1,61; 2,75)
IL-8	24,10 (5,20; 61,30); p = 0,0001	1,63 (1,04; 2,53)
IL-10	38,40 (16,60; 78,80); p = 0,0001	1,27 (0,92; 2,14)
IL-17	36,70 (12,20; 60,20); p = 0,0001	1,50 (0,87; 6,15)
IL-18	1,30 (1,11; 1,50); p = 0,019	1,85 (1,12; 2,81)
IL-1β	22,70 (13,10; 76,60); p = 0,013	12,22 (6,19; 37,34)
IL-1ra	12,80 (8,50; 16,43); p = 0,0001	1,54 (0,97; 4,77)
TNFα	62,70 (28,90; 123,80); p = 0,0001	4,08 (1,97; 8,61)
IFNγ	477,80 (137,30; 720,90); p = 0,0001	1,70 (0,85; 3,07)
G-CSF	51,40 (17,50; 132,70); p = 0,0001	1,47 (0,99; 2,08)
GM-CSF	17,60 (7,70; 25,50); p = 0,0001	2,60 (1,39; 7,94)
VEGF	2,20 (1,70; 3,09); p = 0,0001	0,50 (0,40; 0,90)
MCP-1	1,26 (0,50; 2,70)	1,10 (0,50; 2,00)

ТАБЛИЦА 6. ИНДЕКСЫ ВЛИЯНИЯ ПОЛИКЛОНАЛЬНЫХ АКТИВАТОРОВ (ИВПА) НА ПРОДУКЦИЮ ЦИТОКИНОВ КЛЕТКАМИ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ И ОПУХОЛИ У БОЛЬНЫХ С ИНВАЗИВНЫМ ПРОТОКОВЫМ РАКОМ В ВОЗРАСТЕ 61-77 ЛЕТ

TABLE 6. STIMULATION INDEXES OF POLYCLONAL ACTIVATORS (SIPA) ON CYTOKINE PRODUCTION BY PERIPHERAL BLOOD CELLS AND TUMOR IN PATIENTS WITH INVASIVE DUCTAL CARCINOMA AGED 61-77 YEARS

Цитокин Cytokine	**Концентрация в супернатанте, пг/мл** Concentration the supernatant, pg/ml	
	Периферическая кровь Peripheral blood **n = 23**	**Опухоль и ее микроокружение** Tumor and microenvironment **n = 23**
	Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)	**Me ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)**
IL-2	6,40 (3,50; 11,40); p = 0,0001	1,12 (1,00; 4,55)
IL-6	51,49 (20,81; 301,80); p = 0,0001	1,88 (1,00; 3,01)
IL-8	27,30 (11,30; 49,17); p = 0,0001	1,67 (0,89; 2,51)
IL-10	34,98 (15,90; 48,90); p = 0,0001	1,69 (0,60; 5,42)
IL-17	22,60 (10,80; 44,10); p = 0,0001	1,00 (0,71; 1,70)
IL-18	1,23 (1,10; 1,35); p = 0,006	2,31 (1,23; 3,40)
IL-1β	39,08 (26,40; 176,90); p = 0,002	12,66 (5,00; 42,17)
IL-1ra	11,85 (8,20; 14,80); p = 0,0001	2,10 (1,14; 3,25)
TNFα	27,30 (2,96; 160,90); p = 0,0001	2,29 (1,42; 7,07)
IFNγ	133,20 (0,36; 395,50); p = 0,030	0,66 (0,44; 2,75)
G-CSF	68,50 (20,10; 369,30); p = 0,0001	1,06 (0,95; 2,39)
GM-CSF	13,00 (6,10; 31,90); p = 0,0001	4,00 (2,23; 8,11)
VEGF	3,00 (2,10; 3,90); p = 0,0001	0,85 (0,40; 1,20)
MCP-1	1,31 (0,50; 3,32)	1,10 (0,51; 2,35)

IL-10, IL-17, IL-18, IL-1β, IL-1ra, TNFα, IFNγ, G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), MCP-1 (моноцитарный хемотаксический протеин-1) с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест».

ИВПА на продукцию цитокинов ИКК крови, а также опухолью и ее микроокружением высчитывали по формуле: ИВПА = А/Б, где А – уровень стимулированной поликлональными активаторами продукции цитокина, Б – уровень спонтанной продукции цитокина.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Показатели выражали в виде медианы – Me, нижнего и верхнего процентилей ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$), рассчитывали коэффициент ранговой корреляции Спирмена (r) и его достоверность (p). Для определения достоверности различий между встречаемостью лимфоузлов, пораженных метастазами (%) на момент исследования, в исследуемых возрастных группах использовали критерий Фишера (ϕ).

Результаты

Определение спонтанной продукции цитокинов выявило достоверное повышение концентрации IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1ra, IFNγ, G-CSF, GM-CSF и VEGF в супернатанте клеток опухоли и ее микроокружения по сравнению с супернатантом клеток периферической крови как в I, так и во II группе больных (табл. 1, 2).

После инкубации с ПА отмечалось повышение концентрации IL-2, IL-10, IL-17, IL-1β, TNFα, IFNγ и снижение концентрации IL-6, IL-8, IL-18, IL-1ra, G-CSF, GM-CSF и VEGF в супернатанте клеток периферической крови по сравнению с супернатантом клеток опухоли у больных I группы (табл. 3). В группе II отмечены аналогичные различия по указанным выше концентрациям цитокинов в супернатанте клеток крови за исключением IL-8 и GM-CSF (табл. 4).

Анализ ИВПА на цитокинпродуцирующий потенциал клеток показал, что в обеих возрастных группах его значения относительно супернатанта клеток крови были достоверно выше для всех исследуемых цитокинов по сравнению с ИВПА относительно супернатанта опухоли и ее микроокружения, за исключением IL-18 и белка

MCP-1. ИВПА на продукцию IL-18 иммунокомпетентными клетками крови был снижен по сравнению с аналогичным показателем супернатанта опухоли и ее микроокружения (табл. 5 и 6).

Сравнение продукции цитокинов клетками периферической крови у пациентов разных возрастных групп выявило достоверные различия ИВПА на продукцию IFNγ: группа I – Me = 477,80 ($Q_{0,25}$ = 137,30, $Q_{0,75}$ = 720,90), группа II – Me = 133,20 ($Q_{0,25}$ = 0,36, $Q_{0,75}$ = 395,50); p = 0,008; на продукцию VEGF: группа I – Me = 2,20 ($Q_{0,25}$ = 1,70, $Q_{0,75}$ = 3,09), группа II – Me = 3,00 ($Q_{0,25}$ = 2,10, $Q_{0,75}$ = 3,90); p = 0,047.

При сравнении продукции цитокинов опухолью и ее микроокружением у пациентов разных возрастных групп отмечались достоверные различия в спонтанной продукции IL-6: группа I – Me = 52440,00 ($Q_{0,25}$ = 36300,00, $Q_{0,75}$ = 69740,00), группа II – Me = 41040,00 ($Q_{0,25}$ = 21820,00, $Q_{0,75}$ = 46980,00); p = 0,037 и продукции VEGF: группа I – Me = 2951,20 ($Q_{0,25}$ = 2242,00, $Q_{0,75}$ = 4607,40), группа II – Me = 2164,40 ($Q_{0,25}$ = 1346,60, $Q_{0,75}$ = 3243,00); p = 0,007. Влияние ПА в этих группах привело к различиям в концентрациях IFNγ: группа I – Me = 36,50 ($Q_{0,25}$ = 10,50, $Q_{0,75}$ = 64,50), группа II – Me = 12,30 ($Q_{0,25}$ = 8,30, $Q_{0,75}$ = 28,70); p = 0,035, что отражалось и в различии ИВПА на продукцию IFNγ: группа I – Me = 1,70 ($Q_{0,25}$ = 0,85, $Q_{0,75}$ = 3,07), группа II – Me = 0,66 ($Q_{0,25}$ = 0,44, $Q_{0,75}$ = 2,75); p = 0,012.

Обсуждение

Известно, что опухоль и клетки, входящие в состав ее микроокружения, способны продуцировать широкий спектр цитокинов и факторов роста, которые формируют среду, наиболее благоприятную для ее прогрессии [10, 21, 23, 25]. В первую очередь, их действие, так или иначе, направлено на ангиогенез, обеспечивающий трофику новообразования и поддержание его жизнедеятельности. В обеих возрастных группах пациентов отмечалось повышение концентрации IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, IL-18, IL-1ra, G-CSF, GM-CSF и VEGF в супернатанте клеток опухоли и ее микроокружения, что свидетельствовало о высокой функциональной активности новообразования в совокупности с его микроокружением и способствовало формированию новых кровеносных сосудов, что, естественно, повышало вероятность метастазирования. Хотя самой опухолью, помимо ее микроокружения, продуцируются не все из вышеуказанных цитокинов, а только IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-18 и VEGF [4].

Ангиогенез в очаге опухолевого роста обеспечивается фактором VEGF, продукция которого стимулируется прямо или косвенно действием других цитокинов, в частности IL-6 и GM-CSF [14]. IL-6 является провоспалительным цитокином, продуцируется моноцитами, макрофагами, фибробластами, эндотелиальными клетками, Т- и В-лимфоцитами. IL-6 способен стимулировать пролиферативную активность клеток злокачественного новообразования, их инвазию, метастазирование и обеспечивать ангиогенез [12, 18, 21, 27]. При РМЖ это было показано на примере белка Онкостатина М, принадлежащего семейству IL-6 и продуцируемого опухоль-ассоциированными нейтрофилами и макрофагами, которые наиболее часто обнаруживаются в опухолевых инфильтратах при различных видах рака [26]. Сигнал на нейтрофилы поступает от фактора роста GM-CSF, который выступает в роли активатора, нейтрофилы синтезируют Онкостатин М и сохраняют его в гранулах. Клеточные контакты между нейтрофилами и опухолевыми клетками способствуют его выбросу, он связывается с рецептором на опухолевых клетках, увеличивая их подвижность, секрецию VEGF и повышая инвазивность опухоли. Таким образом, нейтрофилы, являясь источником Онкостатина М, индуцируют прогрессию и метастазирование опухоли [26, 28]. Полученные достоверные различия между встречаемостью лимфоузлов с метастазами в разных возрастных группах предполагают более интенсивный рост опухоли и повышение вероятности метастазирования у пациентов в возрасте 40-60 лет (определение критерия Фишера показало (p = 0,034), что согласуется с данными о достоверном повышении концентраций IL-6 и VEGF при их спонтанной продукции в I группе пациентов по сравнению с группой II.

Еще одним цитокином, также оказывающим стимулирующее действие на ангиогенез, является IL-8, который реализует этот эффект не прямо, а через действие протеинкиназ, повышающих выживаемость опухолевых клеток, усиливающих их пролиферацию и миграцию, способствуя инвазивности опухоли [6, 12, 30]. К цитокинам, косвенно регулирующим продукцию факторов, принимающих участие в формировании сосудистой сети опухоли, относится и IL-17, который является провоспалительным и, к тому же, стимулирует синтез такого важного медиатора как TNFα [15]. Особая роль в стимуляции опухолевой прогрессии принадлежит IL-18, действие которого направлено на поддержание ангиогенеза, инвазии и метастазирования за счет увеличения миграции эндотелиальных клеток и опухолевых клеток вследствие экспрессии молекул адгезии на эндотелии сосудов и непосредственной активации протеинкиназы MAPK в опухолевых клетках

[34]. IL-18 повышает продукцию VEGF и тромбоспондина-1 [11], усиливает синтез матриксных металлопротеиназ клетками злокачественного новообразования и его микроокружения [20], а также стимулирует пролиферацию клеток неоплазмы и синтез в них эндогенных кислородных радикалов, вызывающих экспрессию FasL, что приводит к Fas-опосредованному апоптозу иммунокомпетентных клеток, контактирующих со злокачественным новообразованием [24].

Наряду с факторами, способствующими канцерогенезу, клетками опухоли и ее микроокружения продуцируются цитокины, обладающие противоопухолевым эффектом, в частности IL-10 и IFNγ [7, 9], повышение концентраций которых отмечалось в супернатанте опухоли у больных обеих групп. IFNγ также ингибирует продукцию IL-8 [6]. Что касается IL-1ra, относящегося к противовоспалительным цитокинам, повышение его концентрации может быть маркером степени выраженности воспалительной реакции при раке [8]. Не исключено, что повышенная секреция IL-1ra позволяет неоплазме поддерживать воспаление на уровне, необходимом ей для создания оптимальных условий жизнедеятельности, а также ингибировать чрезмерно выраженную воспалительную реакцию, которая может привести к повышенной деструкции опухолевой ткани [32]. Регуляторное воздействие IL-1ra на ангиогенез было продемонстрировано через ингибирование продукции VEGF [17, 22]. Таким образом, наблюдаемое нами повышение концентрации цитокинов при их спонтанной продукции опухолью и ее микроокружением связано с обеспечением роста и метастазирования новообразования и отражает сложные взаимосвязи между цитокинами с проопухолевым и противоопухолевым действием.

Добавление ПА в среду культивирования приводило к повышению концентраций IL-2, IL-10, IL-17, IL-1β, IL-1ra, TNFα и IFNγ в супернатанте иммунокомпетентных клеток крови, что свидетельствовало об их высоком цитокинпродуцирующем потенциале. IL-2, являясь регуляторным цитокином, способен увеличивать продукцию IL-10 NK-клетками периферической крови [31], а также стимулировать синтез IL-10 и IL-17 Т-регуляторными клетками [13, 33], что объясняет повышение концентрации цитокинов этой группы в супернатанте клеток крови. В ранее проведенных исследованиях было показано, что чем выше продукция IL-2 и IFNγ, цитокинов, стимулирующих цитотоксическую активность иммунокомпетентных клеток, тем ниже содержание Ki67-позитивных клеток в опухоли, показатель, отражающий их пролиферативную активность и сопряженный с большей тяжестью опухолевой прогрессии [1]. Наибольшие различия в концентрациях IFNγ при воздействии ПА были получены в супернатанте клеток крови обеих групп пациентов, при этом у больных в возрасте 40-60 лет ИВПА на его продукцию был в несколько раз выше аналогичного показателя больных в возрасте 61 и более лет. Следовательно, противоопухолевый потенциал лимфоцитов в микроокружении опухоли не реализован, о чем свидетельствовало различие в спонтанной продукции IFNγ в группах с различной встречаемостью лимфоузлов, пораженных метастазами.

Повышение ИВПА на продукцию практически всех цитокинов в супернатанте крови по сравнению с показателями супернатанта опухоли можно также объяснить изначально высокими уровнями спонтанной продукции цитокинов опухолью и ее микроокружением, обеспечивающими злокачественную прогрессию [16, 19], поэтому действие ПА на опухоль не приводило к такому же эффекту, как при действии на ИКК крови. Единственным цитокином, к продукции которого клетки опухоли и микроокружения сохраняли высокий потенциал, был IL-18, что подтверждает его важную роль в канцерогенезе.

Таким образом, опухоль и клетки ее микроокружения вырабатывают широкий спектр цитокинов и факторов роста, о чем свидетельствовали высокие уровни их спонтанной продукции. Цитокины, обладающие разнонаправленными эффектами, объединены в единую сеть межклеточных взаимодействий, которые прямо или при помощи посредников стимулируют ангиогенез, направленный на обеспечение трофики растущего новообразования, усиливают пролиферативную активность опухолевых клеток, их инвазию и метастазирование. На основании данных о влиянии поликлональных активаторов на цитокинпродуцирующую функцию клеток опухоли и крови можно прийти к выводу о том, что постоянно циркулирующие иммунокомпетентные клетки, обладая высокой способностью к секреции исследованных цитокинов, являются тем резервом, который обеспечивает опухолевую прогрессию.

Список литературы / References

1. Аутеншлюс А.И., Соснина А.В., Великая Н.В., Фурсов С.А., Михайлова Е.С., Исакова Н.Б., Морозов Д.В., Лыков А.П., Вараксин Н.А. Оценка цитокинпродуцирующей функции клеток крови и пролиферативной активности опухолевых клеток при раке толстой кишки // Российский аллергологический журнал, 2011. № 4. С. 34-35. [Autenshlyus A.I., Sosnina A.V., Velikaya N.V., Fursov S.A., Mikhailova E.S., Isakova N.B.,

Morozov D.V., Lykov A.P., Varaksin N.V. Estimation of cytokine-producing function of blood cells and proliferative activity of tumor cells in colon cancer. *Rossiyskiy allergologicheskiy zhurnal = Russian Allergological Journal, 2011, no. 4, pp. 34-35.* (In Russ.)]

2. Косенок В.К., Бельская Л.В., Массард Ж., Вьюшков Д.М. Статистические особенности заболеваемости раком молочной железы в Омской области // Вопросы онкологии, 2016. Т. 62, № 4. С. 410-415. [Kosenok V.K., Belskaya L.V., Massard Zh., Viyushkov D.M. Statistical features of breast cancer incidence in the Omsk region. *Voprosy oncologii = Problems in Oncology, 2016, Vol. 62, no. 4, pp. 410-415.* (In Russ.)]

3. Кунц Т.А., Карпухина К.В., Михайлова Е.С., Маринкин И.О., Вараксин Н.А., Аутеншлюс А.И., Ляхович В.В. Влияние поликлональных активаторов на продукцию цитокинов клетками крови и злокачественных новообразований молочной железы // Доклады академии наук, 2016. Т. 466, № 1. С.117-119. [Kunts T.A., Marinkin I.O., Karpukhina K.V., Mikhaylova E.S., Autenshlyus A.I., Lyakhovich V.V., Varaksin N.A. Effect of polyclonal activators on cytokine production by blood cells and by malignant breast cancer cells. *Doklady akademii nauk = Reports of the Academy of Sciences, 2016, Vol. 466, no. 1, pp. 117-119*. (In Russ.)]

4. Соснина А.В., Великая Н.В., Вараксин Н.А., Гришаев М.П., Аутеншлюс А.И. Роль цитокинов в патогенезе злокачественных новообразований. Новосибирск, 2014. 128 с. [Sosnina A.V., Velikaya N.V., Varaksin N.A., Grishaev M.P., Autenshlus A.I. the Role of cytokines in the pathogenesis of malignant tumors]. Novosibirsk, 2014. 128 p.

5. Blaylock R.L. Cancer microenvironment, inflammation and cancer stem cells: a hypothesis for a paradigm change and new targets in cancer control. *Surg. Neurol. Int., 2015, Vol. 6, p. 92.*

6. Brat D.J., Bellail A.C., Van Meir E.G. The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncol., 2005, Vol. 7, no. 2, pp. 122-133.*

7. Conti-Freitas L.C., Foss-Freitas M.C., Mamede R.C.M., Foss N.T. Interferon-gamma and interleukin-10 production by mononuclear cells from patients with advanced head and neck cancer. *Clinics, 2012, Vol. 67, no. 6, pp. 587-590.*

8. Dinarello C.A. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood, 2011, Vol. 117, no. 14, pp. 3720-3732.*

9. Duluc D., Corvaisier M., Blanchard S., Catala L., Descamps P., Gamelin E., Ponsoda S., Delneste Y., Hebbar M., Jeannin P. Interferon-gamma reverses the immunosuppressive and protumoral properties and prevents the generation of human tumor-associated macrophages. *Int. J. Cancer, 2009, Vol. 125, no. 2, pp. 367-373.*

10. Eissa S.A., Zaki S.A., El-Maghraby S.M., Kadry D.Y. Importance of serum IL-18 and RANTES as markers for breast carcinoma progression. *J. Egypt Natl. Canc. Inst., 2005, no. 17, pp. 51-55.*

11. Fabbi M., Carbotti G., Ferrini S. Context-dependent role of IL-18 in cancer biology and counter-regulation by IL-18BP. *J. Leukoc. Biol., 2015, no. 97, pp. 665-675.*

12. Hartman Z.C., Poage G.M., den Hollander P., Tsimelzon A., Hill J., Panupinthu N., Zhang Y., Mazumdar A., Hilsenbeck S.G., Mills G.B., Brown P.H. Growth of triple-negative breast cancer cells relies upon coordinate autocrine expression of the proinflammatory cytokines IL-6 and IL-8. *Cancer Res., 2013, no. 73, pp. 3470-3480.*

13. Hedrich C.M., Rauen T., Apostolidis S.A., Grammatikos A.P., Rodriguez Rodriguez N., Ioannidis C., Kyttaris V.C., Crispin J.C., Tsokos G.C. Stat3 promotes IL-10 expression in lupus T cells through trans-activation and chromatin remodeling. *PNAS, 2014, no. 111, pp. 13457-13462.*

14. Huang S., Wu M., Shun C., Wang H., Lin M. Interleukin-6 increases vascular endothelial growth factor and angiogenesis in gastric carcinoma. *J. Biomed. Sci., 2004, no. 11, pp. 517-527.*

15. Iyoda M., Shibata T., Kawaguchi M., Hizawa N., Yamaoka T., Kokubu F., Akizawa T. IL-17A and IL-17F stimulate chemokines via MAPK pathways (ERK1/2 and p38 but not JNK) in mouse cultured mesangial cells: synergy with TNF-alpha and IL-1beta. *Am. J. Physiol. Renal Physiol., 2010, Vol. 298, no. 3, pp. F779-787.*

16. Jain R.K., Fukumura D., Duda D.G. From the guest editors: role of tumor microenvironment in tumor progression and treatment response: A 30 Years' Journey. *Cancer Journal, 2015, Vol. 21, no. 4, pp. 235-236.*

17. Lindahl G., Saarinen N., Abrahamsson A., Dabrosin C. Tamoxifen, flaxseed, and the lignan enterolactone increase stroma- and cancer cell–derived IL-1Ra and decrease tumor angiogenesis in estrogen-dependent breast cancer. *Cancer Res., 2011. Vol. 71, no. 1, pp. 51-60.*

18. Ma J., Ren Z., Ma Y., Xiao W. Targeted knockdown of EGR-1 inhibits IL-8 production and IL-8-mediated invasion of prostate cancer cells through suppressing EGR-1/NF-kappaB synergy. *J. Biol. Chem., 2009, Vol. 284, no. 50, pp. 34600-34606.*

19. Man Y., Stojadinovic A., Mason J., Avital I., Bilchik A., Bruecher B., Protic M., Nissan A., Izadjoo M., Zhang X., Jewett A. Tumor-infiltrating immune cells promoting tumor invasion and metastasis: existing theories. *J. Cancer, 2013, Vol. 4, no. 1, pp. 84-95.*

20. Marco M., Fortin C., Fulop T. Membrane-type matrix metalloproteinases: key mediators of leukocyte function. *J. Leukoc. Biol., 2013, no. 94, pp. 237-246.*

21. McClintock J.Y., Wagner E.M. Role of IL-6 in systemic angiogenesis of the lung. *J. Appl. Physiol., 2005, Vol. 99, no. 3, pp. 861-866.*

22. Murakami Y., Watari K., Shibata T., Uba M. Ureshino H., Kawahara A., Abe H., Izumi H., Mukaida N., Kuwano M., Ono M. N-myc downstream-regulated gene 1 promotes tumor inflammatoryangiogenesis through JNK activation and autocrine loop of interleukin-1α by human gastric cancer cells. *J. Biol. Chem., 2013, no. 288, pp. 25025-25037.*

23. Odenthal J., Takes R., Friedl P. Plasticity of tumor cell invasion: governance by growth factors andcytokines. *Carcinogenesis, 2016, Vol. 37, pp. 1117-1128.*

24. Park S., Cheon S., Cho D. The dual effects of interleukin-18 in tumor progression. *Cell. Mol. Immunol., 2007, Vol. 4, no. 5, pp. 329-335.*

25. Picon-Ruiz M., Pan C., Drews-Elger K., Jang K., Besser A.H., Zhao D., Morata-Tarifa C., Kim M., Ince T.A., Azzam D.J., Wander S.A., Wang B., Ergonul B., Datar R.H., Cote R.J., Howard G.A., El-Ashry D., Torné-Poyatos P. Marchal J.A., Slingerland J.M. Interactions between adipocytes and breast cancer cells stimulatecytokine production and drive Src/Sox2/miR-302b–mediated malignant progression. *Cancer Res., 2016, no. 76, pp. 491-504.*

26. Queen M.M., Ryan R.E., Holzer R.G., Keller-Peck C.R., Jorcyk C.L. Breast cancer cells stimulate neutrophils to produce oncostatin M: potential implications for tumor progression. *Cancer Res., 2005, no. 65, pp. 8896-8904.*

27. Shida Y., Igawa T., Hakariya T., Sakai H., Kanetake H. p38MAPK activation is involved in androgen-independent proliferation of human prostate cancer cells by regulating IL-6 secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 2007, Vol. 353, no. 3, pp. 744-749.*

28. Smith D.A., Kiba A., Zong Y., Witte O.N. Interleukin-6 and Oncostatin-M synergize with the PI3K/AKT Pathway to promote aggressive prostate malignancy in mouse and human tissues. *Mol. Cancer Res., 2013, no. 11, pp. 1159-1165.*

29. Society A.C. Breast Cancer Facts and Figures 2013–2014. American Cancer Society, Inc., Atlanta, 2013. https://old.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/document/acspc-042725.pdf

30. Sun W., Liu D.B., Li W.W., Zhang L.L., Long G.X., Wang J.F., Mei Q., Hu G.Q. Interleukin-6 promotes the migration and invasion of nasopharyngeal carcinoma cell lines and upregulates the expression of MMP-2 and MMP-9. *Int. J. Oncol., 2014, no. 44, pp. 1551-1560.*

31. Tarrio M.L., Lee S.-H, Fragoso M.F., Sun H-W., Kanno Y., O'Shea J.J., Biron C.A. Proliferation conditions promote intrinsic changes in NK cells for an IL-10 response. *J. Immunol., 2014, no. 193, pp. 354-363.*

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

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

34. Yang Y., Cheon S., Jung M.K., Song S.B., Kim D., Kim H.J., Park H., Bang S.I., Cho D. Interleukin-18 enhances breast cancer cell migration via down-regulation of claudin-12 and induction of thep38 MAPK pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun., 2015, Vol. 10, no. 459 (3), pp. 379-386.*

Авторы:

Кунц Т.А. *— к.б.н., старший научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия*

Михайлова Е.С. *— научный сотрудник Центральной научно-исследовательской лаборатории ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; старший научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск, Россия*

Маринкин И.О. *— д.м.н., профессор, заведующий кафедрой, ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ, г. Новосибирск, Россия*

Вараксин Н.А. *— заведующий лабораторией, АО «Вектор-Бест», Новосибирская область, Россия*

Аутеншлюс А.И. *— д.б.н., профессор, заведующий Центральной научно-исследовательской лабораторией ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения РФ; главный научный сотрудник лаборатории метаболизма лекарств и фармакокинетики ФГБНУ «Научно-исследовательский институт молекулярной биологии и биофизики», г. Новосибирск, Россия*

Authors:

Kunts T.A.*, PhD (Biology), Senior Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*

Mikhaylova E.S.*, Research Associate, Central Research Laboratory, Novosibirsk State Medical University; Senior Research Associate, Laboratory of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Research Institute of Molecular Biology and Biophysics, Novosibirsk, Russian Federation*

Marinkin I.O.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of Department, Novosibirsk State Medical University, Novosibirsk, Russian Federation*

Varaksin N.A.*, Head of Laboratory, JSC "Vector-Best", Novosibirsk Region, Russian Federation*

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

Поступила 17.02.2017
Отправлена на доработку 22.02.2017
Принята к печати 02.05.2017

Received 17.02.2017
Revision received 22.02.2017
Accepted 02.05.2017

АНТИТЕЛА И АНТИ-АНТИТЕЛА К СТЕРОИДНЫМ ГОРМОНАМ И РИСК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Глушков А.Н.[1, 3], Поленок Е.Г.[1], Костянко М.В.[1, 3], Антонов А.В.[2], Вержбицкая Н.Е.[4], Вафин И.А.[5], Рагожина С.Е.[5]

[1] ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия
[2] ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия
[3] ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия
[4] ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное патологоанатомическое бюро», г. Кемерово, Россия
[5] ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия

Резюме. В экспериментах на животных показано, что антитела против стероидных гормонов способны модулировать их содержание в сыворотке крови и тем самым воздействовать на возникновение рака молочной железы (РМЖ). В свою очередь эффекты указанных антител могут изменяться под действием соответствующих антиидиотипических антител. Однако ассоциации антител и антиидиотипических антител с РМЖ у женщин остаются мало изученными.

Цель исследования – выявить возможные ассоциации антител к эстрадиолу и прогестерону (IgG-Es1 и IgG-Pg1) и соответствующих антиидиотипических антител (IgG-Es2 и IgG-Pg2) с РМЖ у женщин в постменопаузе.

Были обследованы 89 здоровых женщин и 273 больных РМЖ. Исследование IgG-Es1 и IgG-Pg1 в сыворотке крови выполняли с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа с использованием конъюгатов Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином в качестве антигенов. Исследование IgG-Es2 и IgG-Pg2 выполняли аналогичным методом с использованием моноклональных антител против Es и Pg в качестве антигенов.

Одновременное отсутствие IgG-Es1 и IgG-Pg1 имело место у 53,9% здоровых женщин и у 41,0% больных РМЖ ($p = 0,04$; $OR = 0,6$). Ig-Es1 без IgG-Pg1 и IgG-Pg1 без Ig-Es1 обнаружили у 15,7% и 20,2% здоровых женщин и у 10,3 и 7,7% больных РМЖ ($p > 0,05$). Одновременное повышение уровней исследуемых антител выявлено у 10,1% здоровых женщин и у 41,0% больных РМЖ ($p < 0,0001$; $OR = 5,3$). Отсутствие IgG-Es2 и IgG-Pg2 (одновременное и каждого по отдельности в присутствии другого) обнаруживали с одинаковой частотой в сравниваемых группах. Одновременное повышение уровней IgG-Es2 и IgG-Pg2 имело место у 52,8% здоровых женщин и у 34,8% больных РМЖ ($p = 0,03$; $OR = 0,4$).

Впервые обнаружены феномены синергизма в иммуностимуляции РМЖ при одновременном образовании IgG-Es1 и IgG-Pg1, а также синергизма в иммуноингибиции РМЖ при одновременном образовании IgG-Es2 и IgG-Pg2. Показана высокая информативность иммуноанализа антител к стероидным гормонам для определения риска РМЖ у женщин в постменопаузе.

Ключевые слова: рак молочной железы, антитела, антиидиотипические антитела, эстрадиол, прогестерон, канцерогенез

Адрес для переписки:
Поленок Елена Геннадьевна
ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел./факс: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: egpolenok@mail.ru

Address for correspondence:
Polenok Elena G.
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
650065, Russian Federation, Kemerovo, Leningradsky ave, 10.
Phone/Fax: 7 (3842) 57-50-79.
E-mail: egpolenok@mail.ru

Образец цитирования:
А.Н. Глушков, Е.Г. Поленок, М.В. Костянко, А.В. Антонов, Н.Е. Вержбицкая, И.А. Вафин, С.Е. Рагожина «Антитела и анти-антитела к стероидным гормонам и риск рака молочной железы» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 577-584.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-577-584

© Глушков А.Н. и соавт., 2017

For citation:
A.N. Glushkov, E.G. Polenok, M.V. Kostyanko, A.V. Antonov, N.E. Verzhbitskaya, I.A. Vafin, S.E. Ragozhina "Antibodies and anti-antibodies to steroid hormones, and breast cancer risk", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 577-584.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-577-584

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-577-584

ANTIBODIES AND ANTI-ANTIBODIES TO STEROID HORMONES, AND BREAST CANCER RISK

Glushkov A.N.[a, c], Polenok E.G.[a], Kostyanko M.V.[c], Antonov A.V.[b], Verzhbitskaya N.E.[d], Vafin I.A.[e], Ragozhina S.E.[e]

[a] *Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation*
[b] *Regional Dispensary for Clinical Oncology, Kemerovo, Russian Federation*
[c] *Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation*
[d] *Pathologoanatomical Bureau, Kemerovo, Russian Federation*
[e] *Regional Blood Center, Kemerovo, Russian Federation*

Abstract. Antibodies against sex steroid hormones are known to modulate their serum concentration and inhibit experimental breast cancer (BC). Hence, these effects could be changed by according anti-idiotypic antibodies. However, relationships between antibodies and anti-idiotypic antibodies and BC in women are still poorly studied. The aim of this study was to identify possible associations between occurrence of antibodies against estradiol and progesterone (IgG-Es1and IgG-Pg1) and according antiidiotypic antibodies (IgG-Es2 and IgG-Pg2), and postmenopausal BC.

Eighty-nine healthy women and 273 BC patients were examined. A non-competitive solid phase immunoassay for IgG-Es1 and IgG-Pg1 was performed using estradiol and progesterone conjugates with bovin serum albumin as antigens. Monoclonal antibodies against Es and Pg as antigens have been used for non-competitive solid phase immunoassay of IgG-Es2 and IgG-Pg2.

Results: absence of both IgG-Es1 and IgG-Pg1 was revealed in 53.9% of healthy donors and 41.0% of BC patients ($p = 0.04$; OR = 0.6). Presence of IgG-Es1 without IgG-Pg1, or IgG-Pg1 without IgG-Es1was detected for, respectively, 15.7% and 20.2% of healthy women, and in 10.3% and 7.7% of BC patients ($p > 0.05$). Simultaneous increase of both IgG-Es1 and IgG-Pg1 was revealed in 10.1% of healthy donors and in 41.0% of BC patients ($p < 0.0001$; OR = 5.3). Absence of a single antibogy (IgG-Es2 or IgG-Pg2) showed similar frequency in the groups under study. Simultaneous increase of both IgG-Es2 and IgG-Pg2 was detected in 52.8% of healthy women and 34.8% of BC patients ($p = 0.03$; OR = 0.4). Conclusion: We have first revealed an immunostimulating synergistic effect of antibodies against sex steroid hormones and immunoinhibitory synergistic effect of appropriate anti-idiotypic antibodies upon the postmenopausal breast cancer risk.

Keywords: breast cancer, antibodies, anti-idiotypic antibodies, estradiol, progesterone, carcinogenesis

Работа выполнена в рамках проекта № VI.59.1.1. Программы фундаментальных научных исследований СО РАН.

Введение

Проблема доклинической диагностики рака молочной железы РМЖ в фазе инициации/промоции остается актуальной в связи с широким распространением этого заболевания и возможностью превентивной терапии селективными модуляторами эстрогеновых рецепторов, тамоксифеном и др. [4, 12, 18, 21]. Одним из маркеров повышенного риска РМЖ является глобулин, связывающий половые гормоны в сыворотке крови [8, 15, 22]. Такой же способностью обладают и антитела к эндогенным стероидам.

Известно, что уровни стероидных гормонов могут изменяться под влиянием специфических антител (АТ) после иммунизации животных [11, 16, 17, 20]. Иммунизация мышей против эстрадиола (Es) приводила к угнетению роста эстроген-зависимых опухолей [6]. Функции АТ к Es и прогестерону (Pg) в патогенезе РМЖ у женщин остаются малоизученными. На основании результатов экспериментальных исследований [6] можно было бы предположить, что АТ против Es выполняют защитную роль и тормозят возникновение РМЖ. В таком случае их содержание в сыворотке крови больных должно быть меньше, чем у здоровых женщин. Однако в предыдущих работах обнаружено, что совместное образование АТ к Es, Pg и бензо[a]пирену ассоциировано с высоким риском РМЖ [3, 9]. Это может свидетельствовать о том, что указанные АТ стимулируют возникновение РМЖ.

Вместе с тем, в сыворотке крови здоровых женщин и больных РМЖ были обнаружены антиидиотипические АТ к Es [2]. Весьма вероятно, что и АТ к Pg индуцируют синтез соответствующих антиидиотипических АТ. Поэтому при дальнейшем изучении специфических иммунных реакций на стероидные гормоны при РМЖ необходимо учитывать совместные эффекты АТ и анти-АТ к стероидным гормонам.

Цель исследования – выявить предполагаемые ассоциации антител к эстрадиолу и прогестерону (IgG-Es1 и IgG-Pg1) и соответствующих анти-идиотипических антител (IgG-Es2 и IgG-Pg2) с РМЖ у женщин в постменопаузе.

Материалы и методы

В обследовании приняли участие 362 женщины в постменопаузе. В исследуемую группу были включены 273 женщины с диагнозом «инвазивная карцинома молочной железы», которые поступили на лечение в Областной клинический онкологический диспансер г. Кемерово. Диагноз рак молочной железы (РМЖ) в каждом случае был подтвержден морфологически. Средний возраст больных РМЖ составил 63,2±8,8 года. В группу сравнения были включены 89 здоровых женщин без патологии молочной железы (средний возраст – 58,8±7,1 лет). Забор периферической крови осуществлялся согласно этическим стандартам в соответствии с Хельсинской декларацией 1975 г. и «Правилами клинической практики в Российской Федерации», утвержденными Приказом Минздрава РФ № 266 от 19.06.2003 г. Все лица, участвовавшие в исследовании, дали информированное письменное согласие на участие в нем.

Иммуноанализ первых АТ к Es и Pg (IgG-Es1, IgG-Pg1) проводили с помощью неконкурентного иммуноферментного анализа в собственной модификации [1]. В качестве антигенов на полистирольные иммунологические планшеты были иммобилизованы конъюгаты Es и Pg с бычьим сывороточным альбумином (BSA). Конъюгат Es-BSA был синтезирован путем присоединения BSA к эстрадиолхинонам, полученным окислением Es солью Фреми. Коньюгат Pg-BSA был получен путем конъюгации гемиглутарата 21-гидроксипрогестерона и BSA карбодиимидным способом. Иммунологические планшеты сенсибилизировали в течение ночи при комнатной температуре. Образцы сыворотки крови в разведении 1:100 вносили по 100 мкл в лунки планшета в дублях, инкубировали 1 ч при 37 °С на шейкере. Связавшиеся АТ выявляли с помощью козьих АТ против IgG человека, меченных пероксидазой хрена (Novex, США), разведение конъюгата 1:10000. Регистрацию адсорбированных на планшете АТ проводили с помощью субстратного буфера, содержащего тетраметилбензидин (TMB, США), на фотометре (Пикон, Россия) при длине волны 450 нм. Уровни АТ выражали в относительных единицах и вычисляли по формуле:

$IgG\text{-}X = (OD_{X\text{-}BSA}\text{-}OD_{BSA})/OD_{BSA}$,

где X = Es, Pg, $OD_{X\text{-}BSA}$ – связывание АТ с конъюгатом Es-BSA или Pg-BSA, OD_{BSA} – фоновое связывание с BSA.

Анализ антиидиотипических АТ к Es и Pg (IgG-Es2, IgG-Pg2) осуществляли на коммерческих наборах «ИммуноФА-Эстрадиол», «ИммуноФА-ПГ» («Иммунотех», Москва) с иммобилизованными на пластике моноклональными АТ против Es и Pg согласно методике [1]. Уровни вторых АТ также выражали в относительных единицах и рассчитывали по отношению связывания сывороточных АТ с иммобилизованными на пластике АТ к Es и Pg (за вычетом фонового связывания с отрицательным контролем) к отрицательному контролю.

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы Statistica 8.0 (StatSoft Inc., USA). Ненормальный характер распределения показателей выявили с помощью критерия Шапиро–Уилка, и в дальнейшем для выявления различий между группами использовали непараметрический критерий χ^2 с поправкой Йейтса на непрерывность вариации. При расчете критерия χ^2 исследуемые признаки группировались в четырехпольную таблицу (d.f. = 1). Для выявления пороговых значений уровней АТ (cut-off) был проведен ROC-анализ [10]. Ассоциации исследуемых АТ и анти-АТ с РМЖ оценивали на основании величины отношения шансов (OR) с доверительным интервалом (CI) при 95% уровне значимости.

Результаты

Ассоциации IgG-Es1 и IgG-Pg1 с РМЖ

С помощью ROC-анализа рассчитали пороговые значения (cut-off) уровней АТ к Es и Pg (IgG-Es1, IgG-Pg1), по которым здоровые женщины и больные РМЖ имели наиболее значимые различия. Таковыми оказались: для IgG-Es1 = 5, для IgG-Pg1 = 4. Затем по количеству (n) и частоте (%) обнаружения низких (≤) и высоких (>) уровней АТ в сравниваемых группах рассчитали значение OR для каждого исследуемого АТ по отдельности и в 4 возможных комбинациях. Результаты представлены в таблице 1.

Обнаружили, что низкие уровни АТ к Es и Pg (IgG-Es≤5, IgG-Pg≤4) у больных РМЖ встречались значимо реже, чем у здоровых женщин. При этом значение OR были меньше 1. Высокие уровни АТ к Es и Pg (IgG-Es1 > 5, IgG-Pg1 > 4) у больных РМЖ встречались чаще, чем у здоровых. OR возрастали до 3,0 и до 2,2 соответственно.

Одновременное отсутствие или низкие уровни и IgG-Es1, и IgG-Pg1 (комбинация 1 в сравнении со всеми остальными случаями) у больных РМЖ обнаруживались реже, чем у здоровых с OR < 1. Ассоциация исследуемых АТ с РМЖ в комбинациях 2-4 рассчитывали путем их сопоставления с частотой комбинации 1. Не выявили статистически значимых различий между сравниваемыми группами по частоте только высоких уровней АТ к Es (IgG-Es1 > 5) при одновременно низких уровнях АТ к Pg (IgG-Pg1≤4) (комбинация 2)

ТАБЛИЦА 1. КОЛИЧЕСТВО СЛУЧАЕВ (N) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ К ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgG-Es1, IgG-Pg1) ОТДЕЛЬНО И В КОМБИНАЦИЯХ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ)

TABLE 1. NUMBER OF CASES (N) AND FREQUENCY (%) OF LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF ANTIBODIES TO ESTRADIOL AND PROGESTERONE (IgG-Es1, IgG-Pg1), WITH RESPECT TO EITHER SEPARATE OR COMBINED EFFECTS IN HEALTHY WOMEN AND BREAST CANCER (BC) PATIENTS

Антитела и их комбинации Antibodies and their combinations	**Здоровые женщины** Healthy women **(N = 89)**	**Больные РМЖ** Breast cancer patients **(N = 273)**	χ^2 (p)	OR (95%CI)
	n/%	**n/%**		
IgG-Es1 ≤ 5 > 5	66/74,2 23/25,8	133/48,7 140/51,3	16,5 (< 0,0001)	0,3 (0,2-0,6) 3,0 (1,8-5,1)
IgG-Pg1 ≤ 4 > 4	62/69,7 27/30,3	140/51,3 133/48,7	8,5 (0,004)	0,5 (0,3-0,8) 2,2 (1,3-3,6)
1. IgG-Es1 ≤ 5 IgG-Pg1 ≤ 4	48/53,9	112/41,0	4,03 (0,04)	0,6 (0,4-0,9)
2. IgG-Es1 > 5 IgG-Pg1≤4	14/15,7	28/10,3	0,1 (0,82)	
3. IgG-Es1 ≤ 5 IgG-Pg1 > 4	18/20,2	21/7,7	3,0 (0,08)	
4. IgG-Es1 > 5 IgG-Pg1 > 4	9/10,1	112/41,0	20,3 (< 0,0001)	5,3 (2,5-11,4)
χ^2 (p) 2-4 χ^2 (p) 3-4	15,2 (0,0001) 28,8 (< 0,0001)			

Примечание. Пороговое значение для антител к эстрадиолу IgG-Es1 = 5, для антител к прогестерону IgG-Pg1 = 4.

Note. Threshold values for IgG-Es1antibodies to estradiol are 5; for antibodies to progesterone IgG-Pg1, are equal to 4.

и только высоких уровнях АТ к Pg (IgG-Pg1 > 4) при одновременно низких уровнях АТ к Es (IgG-Es1≤5) (комбинация 3), хотя в этих случаях имели место тенденции к снижению частоты их обнаружения у больных РМЖ. Одновременное повышение уровней и АТ к Es (IgG-Es1 > 5), и АТ к Pg (IgG-Pg1 > 4) (комбинация 4) обнаружено значимо чаще у больных РМЖ, чем у здоровых женщин (p < 0,0001). При этом значение OR возрастало до 5,3. Между каждой из 2 и 3 комбинаций с одной стороны и комбинацией 4 с другой стороны имела место высокая статистически значимая разница в сравниваемых группах (p < 0,0001).

Таким образом, заключение о низком или высоком риске РМЖ при низких или высоких уровнях только АТ к Es (IgG-Es1) или только АТ к Pg (IgG-Pg1) может оказаться ложным. Поэтому лишь одновременное снижение или повышение уровней исследуемых АТ может служить основанием для оценки риска РМЖ.

Ассоциации IgG-Es2 и IgG-Pg2 с РМЖ

Согласно ROC-анализу пороговыми значениями (cut-off) уровней антиидиотипических АТ к Es и Pg (IgG-Es2, IgG-Pg2) между сравниваемыми группами оказались: для IgG-Es2 = 3, для IgG-Pg2 = 3. Статистически значимых различий по частоте обнаружения высоких (> 3) и низких (≤ 3) уровней анти-АТ к Es (IgG-Es2) между здоровыми женщинами и больными РМЖ не обнаружено (табл. 2). Низкие уровни анти-АТ к Pg (IgG-Pg2 ≤ 3) у больных РМЖ выявлялись статистически значимо чаще, чем у здоровых (p = 0,004). При этом OR составил 2,3. Соответственно, высокие уровни анти-АТ к Pg (IgG-Pg2 > 3) реже встречались у больных РМЖ, чем у здоровых. При этом OR снижался до 0,4.

Одновременно низкие уровни анти-АТ к Es и Pg (IgG-Es2 ≤ 3, IgG-Pg2 ≤ 3) (комбинация 1) у больных РМЖ выявлялись чаще, чем у здоровых женщин, но эти различия оказались статистически не значимы (p > 0,05). Высокие уровни только анти-АТ к Es (IgG-Es2 > 3) при низких уровнях анти-АТ к Pg (IgG-Pg2 > 3) (комбинация 2) встречались чаще у больных РМЖ, чем у здоровых женщин, но эти различия тоже были статистически не значимы (p > 0,05). Не выявили различий по частоте обнаружения только высоких уровней анти-АТ к Es (IgG-Es2 > 3) при низких анти-АТ к Pg (IgG-Pg2 ≤ 3) (комбинация 3). Вместе с тем одновременно повышенные уровни анти-АТ к Es и Pg (IgG-Es2 > 3 и IgG-Pg2 > 3) (комбинация 4) у больных РМЖ выявлялись ста-

ТАБЛИЦА 2. КОЛИЧЕСТВО СЛУЧАЕВ (N) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) УРОВНЕЙ АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgG-Es2 И IgG-Pg2) ОТДЕЛЬНО И В КОМБИНАЦИЯХ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ)

TABLE 2. NUMBER OF CASES (N) AND FREQUENCY (%) OF LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES TO ESTRADIOL (IgG-Es2) AND PROGESTERONE (IgG-Pg2), EITHER SEPARATELY, OR IN COMBINED IN HEALTHY WOMEN,OR BREAST CANCER (BC) PATIENTS

Антитела и их комбинации Antibodies and their combinations	**Здоровые женщины** Healthy women **(N = 89)**	**Больные РМЖ** Breast cancer patients **(N = 273)**	χ^2 (p)	OR (95%CI)
	n/%	**n/%**		
IgG-Es2 ≤ 3 > 3	31/34,8 58/65,2	116/42,5 157/57,5	1,3 (0,25)	
IgG-Pg2 ≤ 3 > 3	20/22,5 69/77,5	109/39,9 164/60,1	8,2 (0,004)	2,3 (1,3-3,9) 0,4 (0,3-0,8)
1. IgG-Es2 ≤ 3 IgG-Pg2 ≤ 3	9/10,1	47/17,2	2,1 (0,15)	
2. IgG-Es2 > 3 IgG-Pg2 ≤ 3	11/12,4	62/22,7	0,01 (0,93)	
3. IgG-Es2 ≤ 3 IgG-Pg2 > 3	22/24,7	69/25,3	0,9 (0,34)	
4. IgG-Es2 > 3 IgG-Pg2 > 3	47/52,8	95/34,8	4,9 (0,03)	0,4 (0,2-0,9)
χ^2 (p) 2-4 χ^2 (p) 3-4	7,1 (0,008) 1,7 (0,19)			

Примечание. Пороговое значение для анти-антител к эстрадиолу IgG-Es2 = 3, для анти-антител к прогестерону IgG-Pg2 = 3.

Note. Threshold values are equal to 3 for anti-antibodies to estradiol IgG-Es2, and 3, for anti-antibodies to progesterone IgG-Pg2.

тистически значимо реже, чем у здоровых женщин (p = 0,03). При этом OR снижался до 0,4. Между частотами обнаружения комбинаций 2 и 4 в сравниваемых группах выявлена статистически значимая разница (p = 0,008).

Таким образом, каждые из исследуемых антиидиотипических АТ по отдельности не были ассоциированы с РМЖ. Одновременное повышение уровней анти-АТ к Es и Pg сопряжено со снижением риска РМЖ.

Соотношение уровней антител и анти-антител к Es и Pg у здоровых женщин и больных РМЖ

Поскольку ассоциации АТ и анти-АТ к Es и Pg с РМЖ оказались разнонаправленными, посчитали целесообразным ввести интегрированный показатель их взаимосвязи с этим заболеванием. Поэтому рассчитали индивидуальные соотношения уровней первых АТ и анти-АТ к Es и Pg (IgG-Es1/Es2 и IgG-Pg1/Pg2) и их пороговые значения (cut-off), по которым различались сравниваемые группы. Для IgG-Es1/Es2 и IgG-Pg1/Pg2 эти значения составили 1,5. В таблице 3 приведены результаты сравнения здоровых женщин и больных РМЖ по рассчитанным соотношениям и их комбинациям.

Выяснилось, что превышение уровня АТ к Es (IgG-Es1) над уровнем анти-АТ к Es (IgG-Es2) в 1,5 раза чаще встречалось у больных РМЖ по сравнению со здоровыми женщинами (p < 0,0001). При этом OR возрастал до 2,9. Если это соотношение было ≤ 1,5, OR снижался до 0,3. Аналогичная закономерность обнаружена при анализе соотношений АТ и анти-АТ к Pg (IgG-Pg1/Pg2) с OR = 1,9 и OR = 0,5 соответственно.

Одновременно низкие значения соотношений АТ и анти-АТ к Es и Pg (IgG-Es1/Es2 ≤ 1,5 и IgG-Pg1/Pg2 ≤ 1,5) (комбинация 1) у больных РМЖ встречались статистически значимо реже, чем у здоровых женщин (p = 0,009). При этом OR = 0,5. Если соотношение АТ и анти-АТ к Es (IgG-Es1/Es2) было > 1,5 при одновременном соотношении АТ и анти-АТ к Pg (IgG-Pg1/Pg2) ≤ 1,5 (комбинация 2), разницы между сравниваемыми группами не было. Повышенные соотношения АТ и анти-АТ к Pg (IgG-Pg1/Pg2 > 1,5) при одновременно низких соотношениях АТ и анти-АТ к Es (IgG-Es1/Es2 ≤ 1,5) у больных РМЖ обнаруживали реже, чем у здоровых женщин, но эти различия были статистически не значимы (p > 0,05). Одновременно высокие значения указанных соотношений (комбинация 4) у больных

ТАБЛИЦА 3. КОЛИЧЕСТВО СЛУЧАЕВ (N) И ЧАСТОТА (%) ОБНАРУЖЕНИЯ НИЗКИХ (≤) И ВЫСОКИХ (>) ЗНАЧЕНИЙ СООТНОШЕНИЯ УРОВНЕЙ АНТИТЕЛ И АНТИИДИОТИПИЧЕСКИХ АНТИТЕЛ К ЭСТРАДИОЛУ И ПРОГЕСТЕРОНУ (IgG-Es1/Es2 И IgG-Pg1/Pg2) ОТДЕЛЬНО И В КОМБИНАЦИЯХ У ЗДОРОВЫХ ЖЕНЩИН И БОЛЬНЫХ РАКОМ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ (РМЖ)

TABLE 3. NUMBER OF CASES (N) AND FREQUENCY (%) FOR LOW (≤) AND HIGH (>) LEVELS OF RATIOS FOR ANTIBODIES AND ANTI-IDIOTYPIC ANTIBODIES LEVELS TO ESTRADIOL AND PROGESTERONE (IgG-Es1/Es2, IgG-Pg1/Pg2) SINGLY AND IN COMBINATIONS AT THE HEALTHY WOMEN AND BREAST CANCER (BC) PATIENTS

Соотношения антител/ анти-антител и их комбинации Ratio of antibodies/ anti-antibodies and their combinations	**Здоровые женщины** Healthy women (N = 89)	**Больные РМЖ** Breast cancer patients (N = 273)	χ^2 (p)	OR (95%CI)
	n/%	n/%		
IgG-Es1/Es2 ≤ 1,5 > 1,5	61/68,5 28/31,5	116/42,5 157/57,5	17,2 (< 0,0001)	0,3 (0,2-0,6) 2,9 (1,8-4,9)
IgG-Pg1/Pg2 ≤ 1,5 > 1,5	66/74,2 23/25,8	161/59,0 112/41,0	5,9 (0,01)	0,5 (0,3-0,8) 1,9 (1,2-3,4)
1. IgG-Es1/Es2 ≤ 1,5 IgG-Pg1/Pg2 ≤ 1,5	45/50,6	94/34,4	6,7 (0,009)	0,5 (0,3-0,8)
2. IgG-Es1/Es2 > 1,5 IgG-Pg1/Pg2 ≤ 1,5	21/23,6	67/24,5	1,5 (0,22)	
3. IgG-Es1/Es2 ≤ 1,5 IgG-Pg1/Pg2 > 1,5	16/18,0	22/8,1	0,9 (0,35)	
4. IgG-Es1/Es2 > 1,5 IgG-Pg1/Pg2 > 1,5	7/7,9	90/33,0	19,6 (< 0,0001)	6,2 (2,6-14,4)
χ^2 (p) 2-4 χ^2 (p) 3-4	8,7 (0,003) 21,1 (< 0,0001)			

Примечание. Пороговое значение для соотношения антител и анти-антител к эстрадиолу IgG-Es1/Es2 = 1,5, для соотношения антител и анти-антител к прогестерону IgG-Pg1/Pg2 = 1,5.

Note. Threshold values for ratio of antibodies/anti-antibodies to estradiol IgG, Es1/Es2 is equal to 1.5; for ratio of antibodies/anti-antibodies to progesterone IgG, Pg1/Pg2 = 1.5.

РМЖ выявлялись чаще, чем у здоровых женщин ($p < 0,0001$). При этом OR возрастал до 6,2. Между каждой из 2 и 3 комбинаций с одной стороны и комбинацией 4 с другой стороны имела место высокая статистическая разница ($p = 0,003$ и $p < 0,0001$ соответственно), что подтверждает результаты, приведенные в таблицах 1 и 2.

Обсуждение

В настоящей работе выяснилось, что АТ против стероидных гормонов ассоциированы с высоким риском РМЖ, в то время как соответствующие антиидиотипические АТ – с низким риском. Механизмы обнаруженных эффектов остаются не раскрытыми. По аналогии с модельными экспериментами на животных [5, 6, 11, 16, 17, 20] можно предположить, что IgG-Es1 и IgG-Pg1 способны изменять содержание Es и Pg в сыворотке крови и влияние последних на клетки мишени, т.е. стимулировать процессы промоции.

При этом появление в сыворотке крови АТ против стероидных гормонов индуцирует синтез соответствующих антиидиотипических АТ. Последние ассоциированы с низким риском РМЖ. Очевидно, IgG-Es2 и IgG-Pg2 конкурируют с Es и Pg за связывание с Ig-Es1 и IgG-Pg1 и тем самым модулируют их эффекты на содержание этих гормонов в сыворотке крови. Кроме того, не исключено, что анти-АТ взаимодействуют с мембранными рецепторами гормонов и могут блокировать их взаимодействие с гормонами или выступать в роли агонистов или антагонистов Es и Pg, как это показано в экспериментальных исследованиях [7, 13, 19].

Особый интерес вызывает то, что описанные эффекты имеют место только при совместном образовании исследуемых АТ. Так, Ig-Es1 без IgG-Pg1 и IgG-Pg1 без Ig-Es1встречаются реже у больных РМЖ, чем у здоровых женщин, т.е. проявляют тенденции к снижению рисков РМЖ. В то время как повышение их уровней в одном образце сыворотки крови у больных РМЖ выявляется значительно чаще, чем у здоровых, с возрастанием OR до 5,3. IgG-Es2 без IgG-Pg2 у боль-

ных РМЖ встречаются чаще, чем у здоровых, т.е. проявляет тенденцию к увеличению риска РМЖ. Частота обнаружения IgG-Pg2 без IgG-Es2 сопоставима в сравниваемых группах. В то время как совместное их образование наблюдается значимо реже у больных РМЖ, чем у здоровых, со снижением OR до 0,4.

Представляется целесообразным дальнейшее изучение механизмов синергических эффектов АТ и анти-АТ к стероидным гормонам при канцерогенезе в эксперименте и при различных опухолях человека. Прикладное значение полученных результатов заключается в возможности использования иммуноанализа АТ к стероидным гормонам в определении риска РМЖ. Ранее при изучении глобулина, связывающего половые гормоны, ассоциации с РМЖ либо не были выявлены [14], либо обнаружена негативная ассоциация с OR = 0,5 ($p < 0,001$) [22]. В настоящей работе низкие значения соотношений АТ и анти-АТ к Es и Pg ассоциировано с низким риском РМЖ (OR = 0,5 95%CI: 0,3-0,8; $p = 0,009$), а высокие значения указанных соотношений – с высоким риском РМЖ (OR = 6,2 95%CI: 2,6-14,4; $p < 0,0001$). Дальнейшие исследования в этом направлении на больших выборках позволят уточнить информационную ценность комплексного иммуноанализа АТ к стероидным гормонам для определения риска РМЖ и, возможно, других гормонозависимых опухолей человека.

Благодарности

Авторы благодарят академика Л.Н. Иванову за содействие в развитии выбранного направления исследований; сотрудников лаборатории иммунохимии Института экологии человека ФИЦ УУХ СО РАН Аносову Т.П., Аносова М.П., Красильникову К.С., Гурова Е.А. за техническую поддержку настоящей работы.

Список литературы / References

1. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Аносова Т.П., Савченко Я.А., Баканова М.Л., Минина В.И., Мун С.А., Ларин С.А., Костянко М.В. Сывороточные антитела к бензо[а]пирену и хромосомные аберрации в лимфоцитах периферической крови у рабочих углеперерабатывающего предприятия // Российский иммунологический журнал, 2011. Т. 5 (14), № 1. С. 39-44. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Anosova T.P., Savchenko Ya.A., Bakanova M.L., Minina V.I., Mun S.A., Larin S.A., Kostyanko M.V. Serum antibodies to benzo[a]pyrene and chromosomal aberrations in lymphocytes peripheral blood at the workers of coal processing enterprise. *Rossijskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2011, Vol. 5 (14), no. 1, pp. 39-44.* (In Russ.)]

2. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Костянко М.В., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е., Вафин И.А., Рагожина С.Е. Ассоциации сывороточных антител к эстрадиолу с рецепторами эстрогенов в опухоли у больных раком молочной железы // Российский иммунологический журнал, 2016. Т. 10 (19), № 2. С. 166-173. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Kostyanko M.V., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E., Vafin I.A., Ragozhina S.E. Associations of the serum antibodies to estradiol and the tumor estrogen receptors at the breast cancer patients. *Rossijskiy immunologicheskiy zhurnal = Russian Journal of Immunology, 2016, Vol. 10 (19), no. 2, pp. 166-173.* (In Russ.)]

3. Глушков А.Н., Поленок Е.Г., Магарилл Ю.А., Аносова Т.П., Антонов А.В., Вержбицкая Н.Е. Антитела к бензо[а]пирену, эстрадиолу и прогестерону у больных раком молочной железы в постменопаузе // Сибирский онкологический журнал, 2016. Т. 15, № 6. С. 28-34. [Glushkov A.N., Polenok E.G., Magarill Yu.A., Anosova T.P., Antonov A.V., Verzhbitskaya N.E. Antibodies to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone in the postmenopausal breast cancer women. *Sibirskiy oncologicheskiy zhurnal = Siberian Journal of Oncology, 2016, Vol. 15, no. 6, pp. 28-34.* (In Russ.)]

4. Bao T., Prowell T., Stearns V. Chemoprevention of breast cancer: tamoxifen, raloxifene, and beyond. *Am. J. Ther., 2006, Vol. 13, no. 4, pp. 337-348.*

5. Bourtourault M., Shacoori V., Guerin J., Saiag B., Rault B. Effects of simultaneous active immunization against 17 beta-estradiol and testosterone on pituitary and ovarian activity in rat. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 1991, Vol. 72, no. 3, pp. 273-284.*

6. Caldwell B.V., Tillson S.A., Esber H., Thorneycroft I.H. Survival of tumors after immunization against estrogens. *Nature, 1971, Vol. 231, no. 14, pp. 118-119.*

7. Chaudhri R.A., Olivares-Navarrete R., Cuenca N., Hadadi A., Boyan B.D., Schwartz Z. Membrane estrogen signaling enhances tumorigenesis and metastatic potential of breast cancer cells via estrogen receptor-α36 (ERα36). *J. Biol. Chem., 2012, Vol. 287, no. 10, pp. 7169-7181.*

8. Fortunati N., Catalano M.G., Boccuzzi G., Frairia R. Sex Hormone-Binding Globulin (SHBG), estradiol and breast cancer. *Mol. Cell. Endocrinol., 2010, Vol. 316, no. 1, pp. 86-92.*

9. Glushkov A., Polenok E., Kostyanko M., Antonov A., Verzhbitskaya N., Vafin I., Ragozhina S. Postmenopausal breast cancer risk in relation to antibodies specific to benzo[a]pyrene, estradiol and progesterone. *Iran. J. Cancer Prev., 2016, Vol. 9 (2), e4212.* doi: 10.17795/ijcp-4212.

10. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J. Intern. Med., 2013, Vol. 4, no. 2, pp. 627-635.*

11. Hillier S.G., Groom G.V., Boyns A.R., Cameron E.H. Effects of active immunisation against steroids upon circulating hormone concentrations. *J. Steroid Biochem., 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 529-535.*

12. LaCroix A.Z., Powles T., Osborne C.K., Wolter K., Thompson J.R., Thompson D.D., Allred D.C., Armstrong R., Cummings S.R., Eastell R., Ensrud K.E., Goss P., Lee A., Neven P., Reid D.M., Curto M., Vukicevic S., PEARL Investigators. Breast cancer incidence in the randomized PEARL trial of lasofoxifene in postmenopausal osteoporotic women. *J. Natl. Cancer Inst., 2010, Vol. 102, no. 22, pp. 1706-1715.*

13. Luconi M., Francavilla F., Porazzi I., Macerola B., Forti G., Baldi F. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid non-genomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids, 2004, Vol. 69, no. 8-9, pp. 553-559.*

14. Manjer J., Johansson R., Berglund G., Janzon L., Kaaks R., Agren A., Lenner P. Postmenopausal breast cancer risk in relation to sex steroid hormones, prolactin and SHBG (Sweden). *Cancer Causes Control, 2003, Vol. 14, no. 7, pp. 599-607.*

15. Naik S.L.D., Hedau S., Bahadur A.K., Saha R., Kaur S., Ray A. Sex hormone binding globulin in breast cancer. *Indian J. Clin. Biochem., 2008, Vol. 23, no. 3, pp. 250-254.*

16. Rawlings N.C., Kennedy S.W., Henricks D.M. The active immunization of the cyclic ewe against an estrone protein conjugate. *Theriogenology, 1979, Vol. 12, no. 3, pp. 139-151.*

17. Schwartz U., Dyrenfurth I., Khalaf S., Vande Wiele R.L., Ferin M. A comparison of the effects of active immunization of female rhesus monkeys to estradiol-17 or progesterone-20-protein conjugates. *J. Steroid Biochem., 1975, Vol. 6, no. 3-4, pp. 541-545.*

18. Sestak I. Preventative therapies for healthy women at high risk of breast cancer. *Cancer Manag. Res., 2014, Vol. 6, pp. 423-430*

19. Somjen D., Kohen F., Lieberherr M. Nongenomic Effects of an anti-idiotypic antibody as an estrogen mimetic in female human and rat osteoblasts. *J. Cell. Biochem., 1997, Vol. 65, no. 1, pp. 53-66.*

20. Sundaram K., Tsong Y.Y., Hood W., Brinson A. Effect of immunization with estrone-protein conjugate in rhesus monkeys. *Endocrinology, 1973, Vol. 93, no. 4, pp. 843-847.*

21. Vogel V.G. Role of hormones in cancer prevention. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. Book, 2014, pp. 34-40.*

22. Zeleniuch-Jacguotte A., Shore R.E., Koenig K.L., Akhmedkhanov A., Afanasyeva Y., Kato I., Kim M.Y., Rinaldi S., Kaaks R., Toniolo P. Postmenopausal levels of estrogen, androgen and SHBG and breast cancer: long-term results of a prospective study. *Brit. J. Cancer, 2004, Vol. 90, no. 1, pp. 153-159.*

Авторы:

Глушков А.Н. *— д.м.н., профессор, директор Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук; профессор кафедры генетики биологического факультета ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия*

Поленок Е.Г. *— к.фарм.н., заведующая лабораторией иммунохимии Института экологии человека ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр угля и углехимии» Сибирского отделения Российской академии наук, г. Кемерово, Россия*

Костянко М.В. *— ведущий инженер кафедры органической химии химического факультета ФГБОУ ВО «Кемеровский государственный университет», г. Кемерово, Россия*

Антонов А.В. *— заведующий маммологическим отделением ГБУЗ КО «Областной клинический онкологический диспансер», г. Кемерово, Россия*

Вержбицкая Н.Е. *— к.м.н., заведующая патологоанатомическим отделением ГБУЗ КО ОТ «Кемеровское областное патологоанатомическое бюро», г. Кемерово, Россия*

Вафин И.А. *— главный врач ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия*

Рагожина С.Е. *— заместитель главного врача по медицинской части ГКУЗ КО «Кемеровский областной центр крови», г. Кемерово, Россия.*

Authors:

Glushkov A.N.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences; Professor, Department of Genetics, Faculty of Biology, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation*

Polenok E.G.*, PhD (Pharmacy), Chief, Laboratory of Immunochemistry, Institute of Human Ecology, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry, Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Kemerovo, Russian Federation*

Kostyanko M.V.*, Leading Engineer, Department of Organic Chemistry, Faculty of Chemistry, Kemerovo State University, Kemerovo, Russian Federation*

Antonov A.V.*, Chief, Mammology Department, Regional Clinical Oncology Dispensary, Kemerovo, Russian Federation*

Verzhbitskaya N.E.*, PhD (Medicine), Chief, Department of Pathology, Regional Pathologoanatomical Bureau, Kemerovo, Russian Federation*

Vafin I.A.*, Physician-in-Chief, Regional Blood Center, Kemerovo, Russian Federation*

Ragozhina S.E.*, Medical Director, Regional Blood Center, Kemerovo, Russian Federation*

Поступила 13.01.2017
Отправлена на доработку 26.01.2017
Принята к печати 27.02.2017

Received 13.01.2017
Revision received 26.01.2017
Accepted 27.02.2017

АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С НЕВЫНАШИВАНИЕМ БЕРЕМЕННОСТИ

Гордеева Л.А.[1], Оскорбина О.С.[1], Воронина Е.Н.[2], Соколова Е.А.[2], Шаталина И.В.[1], Оленникова Р.В.[3], Нерсесян С.Л.[3], Филипенко М.Л.[2], Глушков А.Н.[1]

[1] Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия

[2] ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, г. Новосибирск, Россия

[3] ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», медико-генетическая консультация, г. Кемерово, Россия

Резюме. Изучали ассоциации полиморфизма генов цитокинов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR, интрон 2), *IL4* (VNTR, интрон 3), *TNFA* (rs1800629, rs361525), *IL6* (rs1800795) и *IL10* (rs1800896) с НБ у женщин. Были обследованы 112 образцов ДНК женщин с невынашиванием беременности (НБ) и 267 образцов ДНК женщин с физиологической беременностью. Типирование полиморфизма генов *IL1RN* (VNTR, интрон 2), *IL4* (VNTR, интрон 3) проводили с помощью полимеразно-цепной реакции (ПЦР), генов *IL1B* (rs1143634) и *IL6* (rs1800795) – с помощью полиморфизма длин рестрикционных фрагментов, а генов *TNFA* (rs1800629, rs361525) и *IL10* (rs1800896) – с помощью TaqMan ПЦР в режиме реального времени. Как показало исследование ассоциации полиморфизма генов *IL1B*, *IL1RN*, *IL10* и *TNFA* у женщин с НБ, а также с ранних самопроизвольных выкидышей отсутствовали. Обнаружены ассоциации аллеля 2R гена *IL4* с НБ у женщин (OR = 1,52, 95%CI = [1,08-2,14]; P-value (cor) = 0,05) и аллеля G гена *IL6* с тремя и более самопроизвольными выкидышами (OR = 2,10, 95%CI = [1,24-3,56]; P-value (cor) = 0,05), согласно аддитивной модели наследования признака. Оценивая полученные данные, можно заключить, что полиморфизм генов *IL4* (VNTR интрон 3) и *IL6* (rs1800795) у женщин оказывает влияние на развитие раннего самопроизвольного прерывания беременности. Полученные результаты могут быть полезными в понимании молекулярных механизмов раннего самопроизвольного выкидыша.

Ключевые слова: цитокины, генетический полиморфизм, невынашивание беременности, ранний самопроизвольный выкидыш

Адрес для переписки:
Гордеева Людмила Александровна
Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека СО РАН)
650065, Россия, г. Кемерово, Ленинградский пр., 10.
Тел./факс: 8 (3842) 57-50-79.
E-mail: gorsib@rambler.ru, ihe@kemtel.ru

Address for correspondence:
Gordeeva Ludmila A.
Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry (Institute of Human Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences)
650065, Russian Federation, Kemerovo, Leningradsky pr., 10.
Phone/Fax: 7 (3842) 57-50-79.
E-mail: gorsib@rambler.ru, ihe@kemtel.ru

Образец цитирования:
Л.А. Гордеева, О.С. Оскорбина, Е.Н. Воронина, Е.А. Соколова, И.В. Шаталина, Р.В. Оленникова, С.Л. Нерсесян, М.Л. Филипенко, А.Н. Глушков «Ассоциации полиморфизма генов цитокинов с невынашиванием беременности» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 585-596.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-585-596

© Гордеева Л.А. и соавт., 2017

For citation:
L.A. Gordeeva, O.S. Oskorbina, E.N. Voronina, E.A. Sokolova, I.V. Shatalina, R.V. Olennikova, S.L. Nersesyan, M.L. Filipenko, A.N. Glushkov "Association between cytokine gene polymorphisms and recurrent miscarriage", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 585-596.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-585-596

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-585-596

ASSOCIATION BETWEEN CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS AND RECURRENT MISCARRIAGE

Gordeeva L.A.[a], Oskorbina O.S.[a], Voronina E.N.[b], Sokolova E.A.[b], Shatalina I.V.[a], Olennikova R.V.[c], Nersesyan S.L.[c], Filipenko M.L.[b], Glushkov A.N.[a]

[a] *Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry (Institute of Human Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences), Kemerovo, Russian Federation*
[b] *Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*
[c] *Kemerovo Regional Clinical Hospital, Genetic Consulting Center, Kemerovo, Russian Federation*

Abstract. Associations between *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR, intron 2), *IL4* (VNTR, intron 3), *TNFA* (rs1800629, rs361525), *IL6* (rs1800795), and *IL10* (rs1800896) genetic polymorphisms in women with recurrent miscarriage (RM) were analyzed. We studied DNA samples of 112 women with RM and 267 women with physiological pregnancy. The *IL1RN, IL4* genotypes were identified by PCR techniques, the *IL1B, IL6* gene polymorphisms were defined by means of RFLP approach. To detect *TNFA* and *IL10* gene polymorphisms, TaqMan real-time PCR was used. The results have shown that polymorphic loci of *IL1B*, *IL1RN*, *IL10, TNFA* genes were not associated with RM, and early spontaneous abortion risk. The 2R allele of *IL4* gene was found to be associated with higher RM risk (OR = 1.52; 95% CI = [1.08-2.14]; P-value (cor) = 0.05), and G allele of *IL6* gene was associated with a risk for > 3 early spontaneous abortions (OR = 2.10; 95% CI = [1.24-3.56]; P-value (cor) = 0.05), in an additive inheritance model. Upon evaluation of the data obtained, one may conclude that the *IL4* (VNTR intron 3) and *IL6* (rs1800795) gene polymorphisms could influence the RM development. These results may be useful for assessment of molecular mechanisms underlying early spontaneous abortion.

Keywords: cytokines, genetic polymorphisms, recurrent miscarriage, early spontaneous abortion

Введение

Несмотря на постоянное усовершенствование медицинских технологий в акушерско-гинекологической практике, они не снижают актуальности проблемы невынашивания беременности (НБ) у женщин. Частота НБ в популяции составляет 2-5% от числа беременностей, а частота самопроизвольного выкидыша в структуре НБ – 15-20% [9].

Причины НБ у женщин достаточно хорошо известны, при этом особое значение отводится иммунологическим нарушениям. При физиологической беременности комплекс иммунных механизмов отвечает за создание благоприятного иммунологического фона для имплантации зародыша, роста и созревания плаценты, а также органогенеза плода [11]. В связи с чем беременность рассматривается как физиологически обусловленное состояние толерантности иммунной системы матери к полуаллогенному плоду [5]. Поэтому любые неудачи беременности, прежде всего, могут быть связаны с отклонением иммунной толерантности матери за счет изменения продукции фетотрофических цитокинов.

Цитокины являются продуктами иммунокомпетентных клеток, в то же время эти клетки сами служат мишенями для цитокинов [12]. Цитокины функционируют в качестве посредников межклеточных и межсистемных взаимодействий, участвуют в формировании и регуляции защитных реакций организма, которые на местном уровне запускают развитие воспаления. При несостоятельности местных защитных реакций цитокины способны запускать системное воспаление, что приводит к развитию острофазового ответа на уровне организма [10]. В норме при беременности соблюдается оптимальный баланс провоспалительных (вырабатываемых Th1-клетками) и противовоспалительных (вырабатываемых Th2-клетками) цитокинов в фетоплацентарном комплексе [11].

Полиморфизм в генах цитокинов оказывает влияние на скорость транскрипции, стабильность или качество мРНК, а также функциональную активность белковых продуктов их экспрессии и имеет выраженную этническую специфику [10]. Ассоциации полиморфизма в генах цитокинов с НБ у женщин неоднократно изучались. Однако результаты исследований в разных популяциях не всегда однозначны. По-

этому **целью данной работы** явилось изучение ассоциаций полиморфизма генов цитокинов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR, интрон 2), *IL4* (VNTR, интрон3), *TNFA* (rs1800629, rs361525), *IL6* (rs1800795) и *IL10* (rs1800896) с НБ у женщин.

Материалы и методы

Выборки

Исследованы образцы ДНК 379 женщин репродуктивного возраста, живущих в Кемеровской области и принадлежащих к русской этнической группе.

Исследуемую группу (НБ) составили 112 образцов ДНК женщин, обратившихся в Медико-генетическую консультацию г. Кемерово в связи с невынашиванием беременности после очередного самопроизвольного выкидыша. На момент обследования женщины не были беременны. У 88 (78,6%) самопроизвольные выкидыши наступали до 12 недель беременности, а у 24 (21,4%) – как до, так и после 12 недель беременности.

Критериями включения в настоящее исследование для женщин с НБ были: а) отсутствие в анамнезе женщин медицинских абортов, родов и внематочных беременностей; б) наличие 2 и более выкидышей; в) отсутствие врожденных аномалий развития матки; г) отсутствие хромосомных аномалий в кариотипе супругов; д) отсутствие репродуктивных проблем у супруга.

90 женщин этой группы имели осложненный акушерско-гинекологический анамнез: отслойка плаценты (40,0%), клинические признаки угрозы прерывания беременности (20,0%), хронический эндометрит (18,9%), фетоплацентарную недостаточность (10,0%), хроническое воспаление придатков матки (7,8%), задержка развития плода (2,2%), эрозию шейки матки (1,1%). На момент обследования 56 женщин имели сопутствующую хроническую патологию: гипофункция щитовидной железы – 12,5%; хронические заболевания ЖКТ (гастрит, холецистит, панкреатит) – 23,2%; вегето-сосудистую дистонию – 9,0%; органов верхних дыхательных путей (ринит, гайморит, тонзиллит) – 9,0%; заболеваний почек (пиелонефрит, мочекаменная болезнь) – 9,0%; избыточную массу тела – 7,1%; сочетание 2-3 хронических заболеваний – 30,2%. Диагностические тесты (ИФА и ПЦР) показали, что 29 (25,9%) женщин были носителями половых вирусных инфекций (цитомегаловирусной и/или герпетической), 12 (10,7%) женщин – носителями инфекции смешанного генеза (бактерии + вирусы), 7 (6,3%) женщин имели бактериальный вагиноз. 64 женщины (57,1%) не были носителями инфекций, передаваемых половым путем. Средний возраст женщин в группе был 30,0±4,7 (SD) лет.

Группу сравнения (контроль) составили образцы ДНК 267 женщин, у которых во время настоящей и предыдущих беременностей отсутствовали спонтанные выкидыши, врожденные аномалии развития у плода (ребенка) и осложнения беременности. 186 женщин (69,7%) имели физиологическую беременность, 81 женщина (31,3%) – роженица условно «здорового» ребенка. На момент обследования 49 женщин имели сопутствующую хроническую патологию, которая включала заболевания ЖКТ (16,3%), почек (16,3%), верхних дыхательных путей (14,3%), вегето-сосудистую дистонию (4,2%) и сочетание 2-3 хронических заболеваний (48,9%). По данным диагностических тестов (ИФА и ПЦР) 14 (5,2%) женщины являлись носительницами половых вирусных инфекций, 5 (1,9%) – половых инфекций смешенного генеза, 12 (4,5%) женщин имели бактериальный вагиноз. Средний возраст женщин в группе был 28,9±4,3 (SD) лет.

Все женщины дали письменное информированное согласие на участие в исследовании. Исследование проводилось с соблюдением условий добровольности и конфиденциальности.

Генотипирование

Образцы ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови с помощью метода фенол-хлороформной экстракции с последующим осаждением этанолом, образцы ДНК хранили при -20 °C.

В работе исследовали содержащие однонуклеотидные замены (SNP) варианты генов: *IL1B* +3953C > T (rs1143634), *TNFA* -308G > A (rs1800629), *TNFA* -238G > A (rs361525), *IL6* -174G > C (rs1800795), *IL10* -1082G > A (rs1800896), и минисателлитные маркеры, характеризующиеся различным числом тандемных повторов (VNTR), во 2 интроне гена *IL1RN* и в 3 интроне гена *IL4*.

Типирование полиморфных локусов *TNFA* (rs361525) и *IL10* (rs1800896) проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени (RealTime) с использованием конкурирующих TaqMan-зондов, комплементарных полиморфным участкам ДНК. Каждый образец амплифицировался с использованием пары специфических праймеров и двух зондов (табл. 1), несущих «гаситель» на 3'-конце и флуоресцентных красителей (FAM и R6G) на 5'-конце.

Детальное описание типирования полиморфизма генов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* (VNTR интрона 2), *IL6* (rs1800795) и *IL4* (VNTR интрона 3) и *TNFA* (rs1800629) представлено в работе [3]. VNTR аллели гена *IL1RN* обозначали следующим образом: аллель *IL1RN**1 содержал четыре тандемных повтора по 86 н.п.; аллель *IL1RN**2 – два

ТАБЛИЦА 1. ПРАЙМЕРЫ И ЗОНДЫ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ НУКЛЕОТИДНОЙ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ ПОЛИМОРФИЗМА В ГЕНАХ *TNFA* (rs361525) И *IL10* (rs1800896)

TABLE 1. SELECTED PRIMERS AND PROBES FOR DETERMINATION OF NUCLEOTIDE SEQUENCE OF *TNFA* (rs361525) AND *IL10* (rs1800896) GENE POLYMORPHISMS

Полиморфизм Polymorphism	**Праймеры** Primers	**Последовательность праймеров** Primer sequences	**Последовательность зондов** Probe sequences
TNFA (rs361525)	**Прямой** Direct	5'-GTCCTACACACAAATCAGTCAGT-3'	5'-Fam-TCCTCCCTGCTCtGATTC-BHQ-3'
	Обратный Reverse	5'-TTGGGGACACACAAGCATCA-3'	5'-R6G-TCCTCCCTGCTCcGATTC-BHQ-3'
IL10 (rs1800896)	**Прямой** Direct	5'-CACAAATCCAAGACAACACTACT -3'	5'-R6G-CTTCCCCcTCCCAAAGAAGC-BHQ-3'
	Обратный Reverse	5'-GATAGGAGGTCCCTTACTTTCC -3'	5'-FAM-CTTCCCCtTCCCAAAGAAGC-BHQ-3'

тандемных повтора; аллель *IL1RN**3 – пять тандемных повторов; аллель *IL1RN**4 – три тандемных повтора. VNTR аллели гена IL4 обозначали как: 2R – два тандемных повтора по 70 н.п., 3R – три тандемных повтора.

Статистическая обработка данных

Статистический анализ полученных результатов проводился с помощью пакета статистических программ Statistica for Windows v. 8.0, ("StatSoft, Inc.") и GenABEL, Genetics программного обеспечения R-project (www.r-project.org). Соответствие частот генотипов изучаемых генов цитокинов равновесию Харди–Вайнберга (HWE) оценивали с помощью критерия χ^2 Пирсона. В этом случае и при использовании других критериев нулевую гипотезу отвергали при P-value ≤ 0,05. Силу ассоциации генотипов с НБ – отношение шансов (odds ratio, OR) и его доверительный интервал (95% CI) оценивали с помощью логистического регрессионного анализа (функция «glm» программы R). В качестве базовой модели исследовали аддитивную модель наследования признака, при которой гомозигота по аллелю риска была закодирована как «2», гетерозигота – «1», а гомозигота по референсному аллелю – «0». Ко всем экспериментально установленным значениям P-value была применена поправка Бонферрони с целью исключения статистических ошибок при множественных сравнениях. Отличия между группами считали статистически значимыми, если экспериментально установленные значения P-value были меньше уровня значимости по Бонферрони:

$$p < \frac{0,05}{m},$$

где m – количество независимых статистических тестов на уровне значимости α.

Результаты и обсуждение

Наше исследование показало, что женщины с НБ и контрольной группы статистически значимо не различались по возрасту, наличию внутриматочных инфекций и хронических заболеваний (табл. 2).

Распределение частот генотипов для полиморфных локусов *IL1B* (rs1143634), *IL1RN* VNTR, *IL4* VNTR, *IL6* (rs1800795), *IL10* (rs1800896) и *TNFA* (rs1800629, rs361525) у женщин с НБ и в контрольной группе соответствовало равновесию Харди–Вайнберга (табл. 3, P(HWE) > 0,05). Для большинства SNP в изучаемых генах цитокинов распределение частот встречаемости генотипов у женщин с НБ и в контроле было сопоставимым (табл. 3). Ассоциации полиморфных маркеров генов цитокинов с предрасположенностью к НБ у женщин отсутствовали, исключение касалось только полиморфизма гена *IL4* (VNTR, интрон 3).

Обнаружено, что при сравнении частот встречаемости генотипов гена *IL4* у женщин с НБ и в контрольной группе наблюдались статически значимые различия между ними. Аллель 2R был ассоциирован с риском развития НБ (OR = 1,52; 95%CI = [1,08-2,14]).

Самопроизвольный выкидыш может быть спровоцирован не только воздействием патогенов, но и зависеть от генетически контролируемой сложной цитокиновой регуляции иммунной системы женщины [11]. Имеются разные точки зрения на само понятие НБ. Отечественные исследователи под НБ подразумевают два и более самопроизвольных выкидыша, тогда как зарубежные – три и более самопроизвольных выкидыша во время беременности [9]. Поэтому далее мы изучали ассоциации полиморфизма в генах цитокинов в подгруппах женщин с двумя и с тремя и более самопроизвольными выкидышами.

ТАБЛИЦА 2. СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУПП

TABLE 2. COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF THE STUDY AND CONTROL GROUPS

Параметр Parameter	**Группа** Group		**P-value***
	НБ Recurrent miscarriage (n = 112)	**Контроль** Control (n = 267)	
Возраст Age			0,06
m±SD	30,0±4,7	28,9±4,3	
min-max	22-42	24-45	
Кол-во выкидышей Number of miscarriages		–	
min-max; m	2-6; 2,4		
2 выкидыша 2 miscarriages	75 (66,9%)		
3 и более выкидышей 3 and more miscarriages	37 (33,1%)		
Хронические заболевания Chronic diseases	56 (50,0%)	49 (18,3%)	0,21
Внутриматочные инфекции Uterine infections	48 (42,8%)	31 (11,6%)	0,15

Примечание. SD – стандартное отклонение; * – P-value оценивали с помощью бинарной логистической регрессии.

Note. SD, standard deviation; *, P-value were calculated by logistic regression.

Ассоциации изучаемых полиморфных маркеров генов цитокинов с двумя самопроизвольными выкидышами у женщин отсутствовали (результаты не показаны). Ассоциации полиморфизма генов *IL1B*, *IL1RN*, *IL4*, *IL10* и *TNFA* у женщин с тремя и более самопроизвольными выкидышами также отсутствовали, за исключением полиморфизма гена *IL6* (rs1800795) (табл. 4). Выявлена ассоциация аллеля G с предрасположенностью к трем и более самопроизвольным выкидышам (OR = 2,10; 95%CI = [1,24-3,56]). Наблюдалась высокая частота встречаемости генотипа GG (46%) и низкая частота встречаемости генотипа CC (11%) у женщин с 3 и более самопроизвольными выкидышами. Частота встречаемости генотипа CC у женщин контрольной группы составила 24% и была сопоставима с таковой у здоровых женщин Западно-Сибирского региона (23,9%, P = 0,98) [15].

Поскольку мы не выявили значимых ассоциаций полиморфизма генов цитокинов с двумя самопроизвольными выкидышами у женщин, можно предположить, что два ранних выкидыша могут иметь случайные причины, иногда даже не связанные друг с другом, тогда как реализация трех и более выкидышей на ранних этапах беременности скорее имеет системный характер.

Таким образом, в результате проведенного исследования обнаружены ассоциации аллеля 2R гена *IL4* (VNTR интрон 3) с НБ у женщин (OR = 1,52, 95%CI = [1,08-2,14]; P-value (cor) = 0,05) и аллеля G гена *IL6* (rs1800795) с тремя и более самопроизвольными выкидышами (OR = 2,10, 95%CI = [1,24-3,56]; P-value (cor) = 0,05). Несмотря на то, что мы не выявили ассоциации с уровнем значимости необходимым для преодоления порога Бонферрони, обе ассоциации имеют пограничный уровень значимости и, на наш взгляд, заслуживают обсуждения.

Физиологическая беременность сопровождается оптимальным соотношением провоспалительных и противовоспалительных цитокинов в фетоплацентарной области. Считается, что доминирование противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) также может приводить к рецидивирующему самопроизвольному прерыванию беременности [37].

Интронная область гена *IL4* (хромосома 5q31.1) содержит VNTR полиморфизм, который характеризуется разным числом тандемных повторов длиной 70 пн. Варианты гена с разным числом копий могут влиять на его транскрипционную активность и стабильность матричной РНК (мРНК), а также предопределять модифицирующие эффекты IL-4 в иммунном ответе.

ТАБЛИЦА 3. АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К НЕВЫНАШИВАНИЮ БЕРЕМЕННОСТИ

TABLE 3. ASSOCIATION OF CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS WITH RECURRENT MISCARRIAGES

Полиморфизм гена/генотип Polymorphisms/genotypes	**НБ (N)** Recurrent miscarriage (N)	**Контроль (n)** Control (n)	**OR [95%CI]; P-value**
IL1B (rs1143634)			
CC CT TT **Аллель риска T** Risk allele T	64 (0,57) 37 (0,33) 11 (0,10) 0,26	153 (0,58) 99 (0,37) 14 (0,05) 0,24	0,48
P (HWE)	0,12	0,70	
IL1RN VNTR*			
*1/*1 *1/*2 *2/*2 *1/*3 *2/*3 **Аллель риска *2** Risk allele *2	53 (0,47) 38 (0,34) 14 (0,13) 4 (0,04) 1 (0,02) 0,30	132 (0,49) 106 (0,40) 23 (0,09) 3 (0,01) 2 (0,01) 0,29	0,46
P (HWE)	0,24	0,83	
IL4 VNTR			
3R/3R 2R/3R 2R/2R **Аллель риска 2R** Risk allele 2R	55 (0,49) 44 (0,39) 13 (0,12) 0,31	163 (0,61) 88 (0,33) 16 (0,06) 0,22	1,52 [1,08-2,14]; 0,01 (cor 0,05)**
P (HWE)	0,36	0,38	
IL6 (rs1800795)			
CC GC GG **Аллель риска G** Risk allele G	24 (0,22) 52 (0,46) 36 (0,32) 0,55	64 (0,24) 136 (0,51) 65 (0,24) 0,50	0,19
P (HWE)	0,52	0,67	
IL10 (rs1800896)			
AA GA GG **Аллель риска G** Risk allele G	41 (0,37) 52 (0,47) 18 (0,16) 0,40	93 (0,36) 124 (0,47) 45 (0,17) 0,41	0,79
P (HWE)	0,82	0,74	
TNFA (rs1800629)			
GG GA AA **Аллель риска A** Risk allele A	93 (0,83) 17 (0,15) 2 (0,02) 0,09	215 (0,82) 45 (0,17) 2 (0,01) 0,09	0,99
P (HWE)	0,26	0,83	
TNFA (rs361525)			
GG GA AA **Аллель риска A** Risk allele A	105 (0,94) 7 (0,06) 0 0,03	250 (0,96) 10 (0,04) 0 0,02	0,31
P (HWE)	0,73	0,75	

Примечание. Здесь и далее в таблице: N – наблюдаемое количество женщин – носителей генотипа; * – носители генотипов IL1RN*1/*3 и IL1RN*2/*3 были исключены из анализа; ** – cor – P-value с учетом коррекции по Бонферрони (количество тестов равно 5).

Note. N, observed number of women with the given genotype; *, carriers of IL1RN*1/*3 and IL1RN*2/*3 genotypes were excluded from analysis; **, cor, P-value calculated with Bonferroni correction (5 tests).

ТАБЛИЦА 4. АССОЦИАЦИИ ПОЛИМОРФИЗМА ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ С ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬЮ К ТРЕМ И БОЛЕЕ САМОПРОИЗВОЛЬНЫМ ВЫКИДЫШАМ

TABLE 4. ASSOCIATION BETWEEN CYTOKINE GENE POLYMORPHISMS WITH THREE AND MORE RECURRENT MISCARRIAGES

Полиморфизм гена/генотип Polymorphisms/genotypes	**≥ 3 выкидышей (N)** ≥ 3 miscarriages (N)	**Контроль (N)** control (N)	**OR [95%CI]; P-value**
IL1B (rs1143634)			
CC CT TT **Аллель риска T** Risk allele T	25 (0,67) 11 (0,30) 1 (0,03) 0,17	153 (0,58) 99 (0,37) 14 (0,05) 0,24	0,22
IL1RN VNTR[b]			
*1/*1 *1/*2 *2/*2 *1/*3 *2/*3 **Аллель риска *2** Risk allele *2	19 (0,51) 11 (0,30) 5 (0,13) 1 (0,03) 1 (0,03) 0,34	132 (0,49) 106 (0,40) 23 (0,09) 3 (0,01) 2 (0,01) 0,29	0,78
IL4 VNTR			
3R/3R 2R/3R 2R/2R **Аллель риска 2R** Risk allele 2R	15(0,40) 18 (0,49) 4 (0,11) 0,35	163 (0,61) 88 (0,33) 16 (0,06) 0,22	1,82 [1,09-3,04]; 0,02 (cor 0,20)
IL6 (rs1800795)			
CC GC GG **Аллель риска G** risk allele G	4 (0,11) 16 (0,43) 17 (0,46) 0,68	64 (0,24) 136 (0,51) 65 (0,24) 0,50	2,10 [1,24-3,56]; 0,005 (cor 0,05)*
IL10 (rs1800896)			
AA GA GG **Аллель риска G** Risk allele G	10 (0,27) 19 (0,51) 8 (0,22) 0,47	93 (0,36) 124 (0,47) 45 (0,17) 0,41	0,28
TNFA (rs1800629)			
GG GA AA **Аллель риска A** Risk allele A	31 (0,84) 6 (0,16) 0 0,08	215 (0,82) 45 (0,17) 2 (0,01) 0,09	0,72
TNFA (rs361525)			
GG GA AA **Аллель риска A** Risk allele A	35 (0,95) 2 (0,05) 0 0,03	250 (0,96) 10 (0,04) 0 0,02	не применимо not applicable

Примечание. * – cor – P-value с учетом коррекции по Бонферрони (количество тестов равно 10).

Note. *, cor, P-value calculated with Bonferroni correction (10 tests).

Аллель с двумя копиями повторов (2R) определяет более высокий уровень транскрипционной активности, сплайсинга и стабильности мРНК по сравнению с аллелем с тремя копиями тандемных повторов (3R) и ассоциирован со сверхпродукцией IL-4. Люди с генотипом 2R/2R гена *IL4* чаще болеют системной красной волчанкой [29], конечной стадией хронической почечной недостаточности [41], тромбозом глубоких вен при болезни Бехчета [25], раком [18, 22], а также чувствительны к внутриклеточному инфицированию [20].

Анализ литературы показал, что изучение ассоциаций полиморфизма VNTR гена *IL4* с репродуктивной патологией у женщин в основном проводилось у азиатских женщин. Как оказалось, у японок и кореянок этот полиморфизм не ассоциирован с повторяющимися самопроизвольными выкидышами [32, 36], а у тайваньских женщин – с осложненной преэклампсией беременностью [26]. Но обнаружено, что у иранских женщин генотип 2R/2R гена *IL4* ассоциирован с преэклампсией и лейомиомой матки [38]. Нам не встретилось ни одной работы, где бы изучались ассоциации VNTR полиморфизма гена *IL4* с репродуктивными нарушениями (в особенности с НБ или самопроизвольными выкидышами) у женщин других рас. Однако следует отметить, что более раннее наше исследование также показало повышенную частоту встречаемости аллеля 2R гена *IL4* среди женщин с НБ и бесплодием, но не с физиологической беременностью [14]. В то же время в литературе нам встретились работы, где выявлены ассоциации аллеля T полиморфизма в промоторном регионе гена *IL4* (-590C > T, rs2243250) с предрасположенностью к НБ [7], преждевременным родам [21] и преэклампсии [23] у женщин европейского происхождения. На уровне популяционных исследований установлено, что эволюционно у людей между аллелем 2R (VNTR, интрон 3) и аллелем T в позиции-590 промоторного региона гена IL4 наблюдается неравновесие по сцеплению [30], оба аллеля ассоциированы с повышенной продукцией молекул IL-4 [31]. Таким образом, наши данные в целом согласуются с литературой.

Как показывают клинические исследования, женщины с НБ имеют низкие сывороточные уровни IL-4 на раннем этапе беременности [13]. Возможно, что перевес в сторону активной продукции противовоспалительных цитокинов (IL-4, IL-10) на раннем этапе беременности может провоцировать повышенную чувствительность женщины к внутриклеточным инфекциям и к отдельным аутоиммунным расстройствам, что также может служить причиной гибели эмбриона. В пользу этого говорят работы, где было найдено, что люди с генотипом 3R/3R, но не с генотипом 2R/2R гена *IL4* устойчивы к ВИЧ и малярийной инфекциям [31, 39]. Причем на примере ВИЧ было найдено, что чем выше отмечалась продукция IL-4 в лимфоузлах, тем сильнее шла репликация вируса [39]. Хронический инфекционно-воспалительный процесс также может изменять антигенную структуру клеток эндометрия и запускать аутоиммунные механизмы [2]. Косвенным подтверждением служат работы, в которых у людей разных этносов аллель 2R гена *IL4* (VNTR, интрон 3) ассоциирован с аутоиммунными расстройствами, где повышенная продукция аутоантител является ключевым механизмом развития болезни [29].

Согласно ставшему «классическим» представлению, перевес в сторону выработки Th1-клетками провоспалительных цитокинов (например, IL-1, TNFα, IL-6, INF и др.) на раннем этапе беременности сопровождается либо выкидышем либо недостаточным внедрением трофобласта в материнские сосуды, ассоциированным с преэклампсией и задержкой развития плода [11]. Нами обнаружена ассоциация полиморфизма гена *IL6* (-174 G > C), но не *IL1B* и *TNFA* с тремя самопроизвольными выкидышами у женщин.

Нуклеотидная замена -174G > C в регуляторном участке гена *IL6* (rs1800795, хромосома 7q21-24) определяет различный конститутивный и индуцибельный уровень его экспрессии *in vitro* и *in vivo*. В исследованиях *in vitro* было обнаружено, что у здоровых людей аллель C коррелирует с низкими плазматическими уровнями IL-6, тогда как аллель G – с высокими плазматическими уровнями [4]. Однако подобная корреляция у женщин с идиопатическим НБ отсутствовала [40]. В то же время женщины с НБ имеют чрезмерную сывороточную продукцию IL-6 на ранних сроках беременности по сравнению с женщинами с физиологической беременностью [13]. Наличие противоречивых литературных данных наводит на мысль, что реализация эффекта полиморфной замены -174G > C на продукцию IL-6 у женщин с НБ связана с воздействием других генетических и средовых факторов.

В литературе ассоциации полиморфизма гена *IL6* (rs1800795) с НБ и другими осложнениями беременности у женщин носят противоречивый характер. Отдельные работы, в том числе и метаанализы, не подтвердили ассоциации полиморфизма гена *IL6* (rs1800795) с НБ [6, 17, 19]. В то же время сообщается об ассоциации генотипа CC гена *IL6* (rs1800795) с самопроизвольными выкидышами у бразильянок [43] и китаянок [28], с преждевременными родами инфекционного генеза у австрийских женщин [35], с сепсисом плода у финок [34]. По данным метаанализа у ев-

ропейских женщин генотип CC гена *IL6* является протективным к преждевременным родам [44]. С другой стороны, выявлены ассоциации генотипа GG гена *IL6* с самопроизвольными выкидышами у китаянок [28], с хориоамнионитом у финок [34], с преждевременными родами после вспомогательных репродуктивных технологий у женщин русской этнической группы [1], но у украинок он является протективным к развитию самопроизвольных выкидышей [27].

Необходимо также отметить, что IL-6 играет важную роль в механизмах взаимодействий между иммунной и эндокринной системами у людей. Речь идет о стероид-опосредованных эффектах IL-6 в репродуктивной физиологии у женщин. Совместно с IL-1, TNFα и IL-6 влияет на регуляцию производства стероидов в яичниках, созревание фолликул, а также на процессы овуляции, оплодотворения и имплантации [16].

Гормональный дисбаланс у женщин до и во время беременности является одной из эндогенных причин самопроизвольных выкидышей на ранних сроках (7-10 недель) [33, 42]. Гиперандрогения (в яичниках и надпочечниках, а иногда и смешанного типа) у женщин оказывает вредное воздействие на развитие эндометрия и снижает жизнеспособность яйцеклетки и эмбриона [42]. Патология эндометрия, обусловленная гормональными нарушениями, не всегда определяется уровнем гормонов в крови [33]. Обнаружено, что полиморфизм гена *IL6* (rs1800795) может оказывать влияние на развитие гиперандрогении у женщин. Обнаружено, что у женщин с генотипом CC гена *IL6* не выявлялся избыток андрогенов в отличие от женщин с генотипом GG. У женщин с гиперандрогенией генотип GG коррелировал с высокими уровнями IL-6, 17-гидроксипрогестерона, кортизола и 11-дезоксикортизола в сыворотке крови [42]. В то же время не так давно проведенный метаанализ показал, что полиморфизм гена *IL6* (rs1800795) не ассоциирован с синдромом поликистозных яичников (СПКЯ), но вариант C чаще наблюдался у женщин без СПКЯ [24].

Надо отметить, что наше исследование выявило разнонаправленные ассоциации аллеля 2R гена *IL4* (повышенная продукция противовоспалительного цитокина *IL4*) и аллеля G гена *IL6* (повышенная продукция плейотропного цитокина *IL6*) с НБ. С одной стороны, возможно, что такая ситуация может провоцировать высокую чувствительность женщин – носительниц этих генетических маркеров к инфекционным агентам. С другой стороны, вполне возможно, что эффект полиморфной замены гена *IL6* (rs1800795) на НБ может быть реализован и не через иммунную систему.

Нужно признать, что выявленные нами ассоциации аллеля 2R гена *IL4* (VNTR, интрон 3) и аллеля G гена *IL6* (rs1800795) с НБ и с тремя и более самопроизвольными выкидышами у женщин имеют низкую прогностическую эффективность. Как показывают статистические расчеты, «...при OR < 2,2 маркер обладает заведомо низкой прогностической эффективностью во всех смыслах и при любых частотах встречаемости заболевания и маркера» [8]. В то же время устойчиво воспроизводящиеся ассоциации этих полиморфных маркеров с патологией беременности у женщин разных этносов указывают на участие полиморфизма генов *IL4* и *IL6* в становлении репродуктивной патологии, поэтому наши результаты могут быть полезными в понимании молекулярных механизмов раннего самопроизвольного выкидыша.

Таким образом, выявлены ассоциации аллеля 2R гена *IL4 (*VNTR, интрон 3) и аллеля G гена *IL6* (rs1800795) с НБ. Наши результаты могут говорить о том, что полиморфизм генов *IL4* и *IL6* у женщин оказывает влияние на развитие раннего самопроизвольного прерывания беременности.

Список литературы / References

1. Александрова Н.В., Донников А.Е. Использование современных ДНК-технологий в прогнозировании акушерских осложнений при беременности высокого риска // Мать и дитя в Кузбассе, 2012. Т. 48, № 1. С. 42-47. [Alexandrova N.V., Donnikov A.E. Prognostic tool of current DNA-technologies in obstetric complications in high risk pregnancy. *Mat' i ditya v Kuzbasse = Mother and Child in Kuzbass, 2012, Vol. 48, no. 1, pp. 42-47*. (In Russ.)]

2. Гестагены у женщин разного возраста. Доказательные данные и клинический опыт. Научные материалы Общероссийского научно-практического семинара «Репродуктивный потенциал России: сибирские чтения». М.: Редакция журнала StatusPraesens, 2012. 24 с. [Gestagens in women of different ages. Evidence data and clinical experience. Research Materials of Russian scientific-practical seminar "The reproductive potential of Russia: Siberian read"]. Moscow: StatusPraesens, 2012. 24 p.

3. Гордеева Л.А., Глушкова О.А, Воронина Е.Н., Шаталина И.В., Шутров А.Е., Попова О.С., Гареева Ю.В., Симонова Т.А., Сутулина И.М., Филипенко М.Л., Глушков А.Н. Ассоциации материнских полиморфизмов генов цитокинов (IL-1B, IL-1RN, TNF, IL-4, IL-6) с врожденными пороками развития у плода и новорожденного // Иммунология, 2013. Т. 34, № 6. С. 298-304. [Gordeeva L.A., Glushkova O.A., Voronina E.N., Shatalina I.V., Shutrov A.E., Popova O.S., Gareeva Yu.V., Simonova T.A., Sutulina I.M., Filipenko M.L., Glushkov A.N. Association

of maternal polymorphisms of cytokine gene (*IL1B, IL1RN, TNF, IL4, IL6*) with congenital malformations in fetus and newborn. *Immunologiya = Immunology, 2013, Vol. 34, no. 6, pp. 298-304.* (In Russ.)]

4. Данилко К.В., Корытина Г.Ф., Ахмадишина Л.З., Янбаева Д.Г., Загидуллин Ш.З., Викторова Т.В. Ассоциация полиморфных маркеров генов цитокинов (*IL1B, IL1RN, TNFA, LTA, IL6, IL8, IL10*) с развитием хронической обструктивной болезни легких // Молекулярная биология, 2007. Т. 41, № 1. С. 26-36. [Danilko K.V., Korytina G.F., Akhmadishina L.Z., Yanbaeva D.G., Zagidullin Sh.Z., Victorova T.V. Association of cytokines genes (*IL1*, *IL1RN*, *TNF*, *LTA*, *IL6*, *IL8*, *IL10*) polymorphic markers with chronic obstructive pulmonary disease. *Molekulyarnaya biologiya = Molecular Biology, 2007, Vol. 41, no. 1, pp. 26-36*. (In Russ.)]

5. Заморина С.А., Ширшев С.В. Хорионический гонадотропин – фактор индукции иммунной толерантности при беременности // Иммунология, 2013. Т. 34, № 2. С. 105-107. [Zamorina S.A., Shirshev S.V. Human chorionic gonadotropin is a factor in the induction of immune tolerance in pregnancy. *Immunologiya = Immunology, 2013, Vol. 34, no. 2, pp. 105-107.* (In Russ.)]

6. Машкина Е.В., Коваленко К.А., Фомина Н.В., Шкурат Т.П. Исследование ассоциации полиморфных вариантов генов цитокинов с ранними эмбриональными потерями // Экологическая генетика, 2014. Т. XII, № 1. С. 19-27. [Mashkina E.V., Kovalenko K.A., Fomina N.V., Shkurat T.P. Cytokine gene polymorphisms and early pregnancy loss. *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics, 2014, Vol. XII, no. 1, pp. 19-27.* (In Russ.)]

7. Питиримова Л.Н. Загороднева Е.А. Гумилевский Б.Ю. Особенности аллельного полиморфизма генов интерлейкинов и цитокиновый баланс женщин с невынашиванием беременности // Акушерство и гинекология, 2014. № 3. С. 33-38. [Pitirimova L.N., Zagorodneva E.A., Gumilevskiy B.U. Specific features of allelic polymorphism of the interleukin genes and the cytokine balance in women with miscarriage. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology, 2014, no. 3, pp. 33-38.* (In Russ.)]

8. Рубанович А.В., Хромов-Борисов Н.Н. Теоретический анализ показателей предсказательной эффективности бинарных генетических тестов // Экологическая генетика, 2013. Т. XI, № 1. С. 77-90. [Rubanovich A.V., Khromov-Borisov N.N. Theoretical analysis of the predictability indices of the binary genetic tests. *Ekologicheskaya genetika = Ecological Genetics, 2013, Vol. XI, no. 1, pp. 77-90.* (In Russ.)]

9. Сидельникова В.М. Невынашивание беременности – современный взгляд на проблему // Российский вестник акушера-гинеколога, 2007. № 2. С. 62-64. [Sidelnikova V.M. Miscarriage: the present view of the problem. *Rossiyskiy vestnik akushera-ginekologa = Russian Bulletin Obstetrician-Gynecologist, 2007, no. 2, pp. 62-64.* (In Russ.)]

10. Симбирцев А.С. Цитокины в патогенезе инфекционных и неинфекционных заболеваний человека // Медицинский академический журнал, 2013. Т. 13, № 3. С. 18-41. [Simbirtsev A.S. Cytokines in the pathogenesis of infectious and noninfectious human diseases. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal = Medical Academic Journal, 2013, Vol. 13, no. 3, pp. 18-41.* (In Russ.)]

11. Сухих Г.Т., Ванько Л.В. Иммунные факторы в этиологии и патогенезе осложнений беременности // Акушерство и гинекология, 2012. № 1. С. 128-136. [Sukhikh G.T., Vanko K.V. Immune factors in the etiology and pathogenesis of pregnancy complications. *Akusherstvo i ginekologiya = Obstetrics and Gynecology, 2012, no. 1, pp. 128-136.* (In Russ.)]

12. Фрейдлин И.С. Иммунная система и ее дефекты. СПб.: Полисан, 1998. 113 с. [Freidlin I.S. The immune system and its defects]. St. Petersburg: Polysan, 1998. 113 p.

13. Чистякова Г.Н., Газиева И.А., Ремизова И.И., Черданцева Г.А. Оценка продукции цитокинов при беременности, осложненной угрозой прерывания в первом триместре // Фундаментальные исследования, 2005. № 5. С. 96-98. [Chistyakova G.N., Gaziyeva I.A., Remizova I.I., Cherdantseva G.A. The evaluation of cytokines production by the threatened abortion in first trimester of pregnancy. *Fundamental'nye issledovaniya = Fundamental Research, 2005, no. 5, pp. 96-98.* (In Russ.)]

14. Шабалдин А.В., Гордеева Л.А., Глушкова О.А., Макарченко О.С., Шаталина И.В., Симонова Т.А., Филипенко М.Л., Глушков А.Н., Крюков П.М. Ассоциации сочетаний генов HLA DRB1*, IL4*, IL6* с репродуктивными потерями у женщин // Иммунология, 2008. Т. 29, № 3. С. 132-136. [Shabaldin A.V, Gordeeva L.A., Glushkova O.A., Makarchenko O.S., Shatalina I.V., Simonova T.A., Filipenko M.L., Glushkov A.N., Kryukov P.M. The association of HLA DRB1*, IL-4*, IL-6* gene combination with women's reproductive losses. *Immunologiya = Immunology, 2008, Vol. 29, no. 3, pp. 132-136.* (In Russ.)]

15. Шевченко А.В., Голованова О.В., Коломейчук М.Ю., Коненков В.И., Гарбуков Е.Ю., Стахеева М.Н. Полиморфизм промоторного региона генов IL-4, IL-6 И IL-10 у пациенток с раком молочной железы // Медицинская иммунология, 2009. Т. 11, № 1. С. 21-28. [Shevchenko A.V., Golovanova O.V., Kolomejtchuk M.Yu., Konenkov V.I., Garbukov E.Yu., Stakheeva M.N. Promotor polymorphism of IL-4, IL-6, and IL-10 genes among patients with breast cancer. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology, 2009, Vol. 11, no. 1, pp. 21-28.* (In Russ.)]. doi: dx.doi.org/10.15789/1563-0625-2009-1-21-28.

16. Ширшев С.В. Механизмы иммунноэндокринного контроля процессов репродукции. Екатеринбург: УрО РАН, 2002, Т. 2, С. 382-392. [Shirshev S.V. Mechanisms of immune and endocrine control of reproduction processes]. Ekaterinburg: UrB RAS, 2002, Vol. 2, pp. 382-392.

17. Bahadori M., Zarei S., Zarnani A.H., Zarei O., Idali F., Hadavi R., Jeddi-Tehrani M. IL-6, IL-10 and IL-17 gene polymorphisms in Iranian women with recurrent miscarriage. *Iran J. Immunol., 2014, Vol. 11, no. 2, pp. 97-104.*

18. Bhayal A.C., Krishnaveni D., Rao K.P., Kumar A.R., Jyothy A.,Nallari P., Venkateshwari A. Significant Association of Interleukin4 Intron 3 VNTR Polymorphism with Susceptibility to Gastric Cancer in a South Indian Population from Telangana. *PLoS One, 2015, Vol. 10, no. 9, e0138442.* doi: 10.1371/journal.pone.0138442.

19. Bombell S., McGuire W. Cytokine polymorphisms in women with recurrent pregnancy loss: meta-analysis. *Aust. N. Z. J. Obstet. Gynaecol., 2008, Vol. 48, no. 2, pp. 147-154.*

20. Cabantous S., Poudiougou B., Oumar A.A., Traore A., Barry A., Vitte J., Bongrand P., Marquet S., Doumbo O., Dessein A.J. Genetic evidence for the aggravation of *Plasmodium falciparum* malaria by interleukin 4. *J. Infect. Dis., 2009, Vol. 200, no. 10, pp. 1530-1539.*

21. Crider K.S., Whitehead N., Buus R.M. Genetic variation associated with preterm birth: a HuGE review. *Genet. Med., 2005, Vol. 7, no. 9, pp. 593-604.*

22. Duan Y., Pan C., Shi J., Chen H., Zhang S. Association between interleukin-4 gene intron3 VNTR polymorphism and cancer risk. *Cancer Cell Int., 2014, Vol. 14, no. 1, p. 131.*

23. Fraser R., Walker J.J., Ekbote U.V., Martin K.L., McShane P., Orsi N.M. Interleukin-4 -590 (C > T), toll-like receptor-2 +2258 (G > A) and matrix metalloproteinase-9 -1562 (C > T) polymorphisms in pre-eclampsia. *BJOG, 2008, Vol. 115, no. 8, pp. 1052-1056.*

24. Guo R., Zheng Y., Yang J., Zheng N. Association of TNF-alpha, IL-6 and IL-1beta gene polymorphisms with polycystic ovary syndrome: a meta-analysis. *BMC Genet., 2015, Vol. 16, p. 5.*

25. Inanir A., Tural S., Yigit S., Kalkan G., Pancar G.S., Demir H.D., Ates O. Association of IL-4 gene VNTR variant with deep venous thrombosis in Behest's disease and its effect on ocular involvement. *Mol. Vis., 2013, no. 19, pp. 675-683.*

26. Kang L., Chen C.H., Yu C.H., Chang C.H., Chang F.M. An association study of interleukin-4 gene and preeclampsia in Taiwan. *Taiwan J. Obstet. Gynecol., 2014, Vol. 53, no. 2, pp. 215-219.*

27. Kucherenko A.M., Vorobiova I.I., Rudakova N.V., Livshits L.A. The role of IL6 and ESR1 gene polymorphisms as immunological factors of pregnancy maintenance. *Biopolymers and Cell, 2013, Vol. 29, no. 5, pp. 402-405.*

28. Liu R.X., Wang Y., Wen L.H. Relationship between cytokine gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion. *Int. J. Clin. Exp. Med., 2015, Vol. 8, no. 6, pp. 9786-9792.*

29. Mohammadoo-Khorasani M., Salimi S., Tabatabai E., Sandoughi M., Zakeri Z., Farajian-Mashhadi F. Interleukin-1β (IL-1β) and IL-4 gene polymorphisms in patients with systemic lupus erythematosus (SLE) and their association with susceptibility to SLE. *Indian J. Med. Res., 2016, Vol. 143, no. 5, pp. 591-596.*

30. Nakashima H., Miyake K., Inoue Y., Shimizu S., Akahoshi M., Tanaka Y., Otsuka T., Harada M. Association between IL-4 genotype and IL-4 production in the Japanese population. *Genes Immun., 2002, Vol. 3, no. 2, pp. 107-109.*

31. Olenscki Gilli S.C., Pericole F.V., Benites B.D., Sippert E.Â., Castilho L.M., Addas-Carvalho M., Olalla Saad S.T. Cytokine polymorphisms in sickle cell disease and the relationship with cytokine expression. *Exp. Hematol., 2016, Vol. 44, no. 7, pp. 583-589.*

32. Parveen F., Shukla A., Agarwal S. Cytokine gene polymorphisms in northern Indian women with recurrent miscarriages. *Fertil Steril., 2013, Vol. 99, no. 2, pp. 433-440.*

33. Pluchino N., Drakopoulos P., Wenger J.M., Petignat P., Streuli I., Genazzani A.R. Hormonal causes of recurrent pregnancy loss (RPL). *Hormones, 2014, Vol. 13, no. 3, pp. 314-322.*

34. Reiman M., Kujari H., Ekholm E., Lapinleimu H., Lehtonen L., Haataja L. PIPARI Study Group. Interleukin-6 polymorphism is associated with chorioamnionitis and neonatal infections in preterm infants. *J. Pediatr., 2008, Vol. 153, no. 1, pp. 19-24.*

35. Resch B., Radinger A., Mannhalter C., Horvath B., Binder A., Zenz W., Walcher W., Haas J., Müller W.D., Pertl B. Maternal interleukin-6 (-174) C/C polymorphism is associated with chorioamnionitis and cysticperiventricular leucomalacia of the preterm infant. *J. Perinatol., 2010, Vol. 30, no. 11, pp. 712-716.*

36. Saijo Y., Sata F., Yamada H., Konodo T., Kato E.H., Kataoka S., Shimada S., Morikawa M., Minakami H., Kishi R. Interleukin-4 gene polymorphism is not involved in the risk of recurrent pregnancy loss. *Am. J. Reprod. Immunol., 2004, Vol. 52, no. 2, pp. 143-146.*

37. Saito S., Nakashima A., Shima T., Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am. J. Reprod. Immunol., 2010, Vol. 63, no. 6, pp. 601-610.*

38. Salimi S., Mohammadoo-Khorasani M., Yaghmaei M., Mokhtari M., Moossavi M3. Possible association of IL-4 VNTR polymorphism with susceptibility to preeclampsia. *Biomed Res Int., 2014, 497031.* doi: 10.1155/2014/497031.

39. Sobti R.C., Berhane N., Mahdi S.A., Takur H., Wanch A. Association of interleukin 4 VNTR polymorphism and HIV/AIDS in a north Indian seropositive patients. *Mol. Biol. Rep., 2012, Vol. 39, no. 3, pp. 3251-3257.*

40. Unfried G., Böcskör S., Endler G., Nagele F., Huber J.C., Tempfer C.B. A polymorphism of the interleukin-6 gene promoter and idiopathic recurrent miscarriage. *Hum. Reprod., 2003, Vol. 18, no. 2, pp. 267-270.*

41. Vasudevan R., Norhasniza M.N., Patimah I. Association of variable number of tandem repeats polymorphism in the IL-4 gene with end-stage renaldisease in Malaysian patients. *Genet. Mol. Res., 2011, Vol. 10, no. 2, pp. 943-947.*

42. Villuendas G., San Millán J.L., Sancho J., Escobar-Morreale H.F. The -597 G-- > A and -174 G-- > C polymorphisms in the promoter of the IL-6 gene are associated with hyperandrogenism. *J. Clin. Endocrinol. Metab., 2002, Vol. 87, no. 3, pp. 1134-1141.*

43. von Linsingen R., Bompeixe E.P., Bicalho Mda G. A case-control study in IL6 and TGFB1 gene polymorphisms and recurrent spontaneous abortion in southern Brazilian patients. *Am. J. Reprod. Immunol., 2005, Vol. 53, no. 2, pp. 94-99.*

44. Wu W., Clark E.A., Stoddard G.J., Watkins W.S., Esplin M.S., Manuck T.A., Xing J., Varner M.W., Jorde L.B. Effect of interleukin-6 polymorphism on risk of preterm birth within population strata: a meta-analysis. *BMC Genet., 2013, Vol. 14, p. 30.*

Авторы:

Гордеева Л.А. *— к.б.н., заведующая лабораторией иммуногенетики, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия*

Оскорбина О.С. *— ведущий инженер-биолог лаборатории иммуногенетики, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия*

Воронина Е.Н. *— к.б.н., научный сотрудник лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

Соколова Е.А. *— к.б.н., инженер лаборатории фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

Шаталина И.С. *— ведущий инженер-биолог лаборатории иммуногенетики, Федеральный исследовательский центр угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия*

Оленникова Р.В. *— врач-генетик ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», медико-генетическая консультация, г. Кемерово, Россия*

Нерсесян С.Л. *— врач-генетик ГАУЗ «Кемеровская областная клиническая больница», медико-генетическая консультация, г. Кемерово, Россия*

Филипенко М.Л. *— к.б.н., заведующий лабораторией фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, г. Новосибирск, Россия*

Глушков А.Н. *— д.м.н., заместитель директора Федерального исследовательского центра угля и углехимии СО РАН (Институт экологии человека СО РАН), г. Кемерово, Россия*

Authors:

Gordeeva L.A.*, PhD (Biology), Head, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry (Institute of Human Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences), Kemerovo, Russian Federation*

Oskorbina O.S.*, Leading Engineer-biologist, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry (Institute of Human Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences), Kemerovo, Russian Federation*

Voronina E.N.*, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

Sokolova E.A.*, PhD (Biology), Engineer, Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

Shatalina I.V.*, Leading Engineer-biologist, Laboratory of Immunogenetics, Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry (Institute of Human Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences), Kemerovo, Russian Federation*

Olennikova R.V.*, Clinical Geneticist, Kemerovo Regional Clinical Hospital, Genetic Consulting Center, Kemerovo, Russian Federation*

Nersesyan S.L.*, Clinical Geneticist, Kemerovo Regional Clinical Hospital, Genetic Consulting Center, Kemerovo, Russian Federation*

Filipenko M.L.*, PhD (Biology), Head, Laboratory of Pharmacogenomics, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russian Federation*

Glushkov A.N.*, PhD, MD (Medicine), Deputy Director, The Federal Research Center of Coal and Coal Chemistry (Institute of Human Ecology, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences), Kemerovo, Russian Federation*

Поступила 23.12.2016
Принята к печати 26.01.2017

Received 23.12.2016
Accepted 26.01.2017

ОСОБЕННОСТИ ИММУННОГО ОТВЕТА И МЕТАБОЛИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ЛИМФОЦИТОВ ПЕРИФЕРИЧЕСКОЙ КРОВИ У ДЕТЕЙ РАННЕГО ВОЗРАСТА С РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ

Куртасова Л.М.[1], Шакина Н.А.[2]

[1] ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия
[2] КГАУЗ « Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия

Резюме. Цель исследования: изучение параметров Т-клеточного и гуморального иммунитета, активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующим обструктивным бронхитом (РОБ). Методы: обследовано 54 ребенка в возрасте 1-3 лет с РОБ. Контрольную группу составили 35 здоровых детей аналогичного возраста. Содержание $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ клеток в периферической крови определяли методом проточной цитофлуориметрии. Концентрацию IgA, IgM, IgG в сыворотке крови оценивали по G. Mancini et al. (1965), ЦИКов по V. Haskova et al. (1978), общих IgE тест-системой «IgE общий – ИФА – Бест» (Россия). Активность НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови изучали биолюминесцентным методом по А.А. Савченко и соавт. (1989).

Результаты: у детей с РОБ установлены изменения фенотипического спектра лимфоцитов периферической крови, статистически значимое снижение концентрации IgA и тенденция к повышению уровня IgE в сыворотке крови. Обнаружено повышение рибозо-5-фосфат и НАДФ-зависимых пластических процессов, снижение анаэробной реакции лактатдегидрогеназы, переноса продуктов липидного катаболизма на гликолиз, роли малатаспартатного шунта в энергетике клетки и активности глутатионредуктазы, повышенный уровень субстратного потока по циклу Кребса в лимфоцитах периферической крови.

Заключение: у детей раннего возраста с РОБ отмечаются изменения фенотипа и энзиматической активности лимфоцитов крови, селективный дефицит IgA в сыворотке крови.

Ключевые слова: бронхит, обструкция, рецидив, лимфоцит, фенотип, иммуноглобулины, метаболизм

Адрес для переписки:
Куртасова Людмила Михайловна
ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ
660022, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 1.
Тел.: 8 (391) 221-06-28.
Факс: 8 (311) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozrenie@yandex.ru

Address for correspondence:
Kurtasova Lyudmila M.
V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
P. Zeleznyak str., 1.
Phone: 7 (391) 221-06-28.
Fax: 7 (311) 221-16-38.
E-mail: sibmed-obozrenie@yandex.ru

Образец цитирования:
Л.М. Куртасова, Н.А. Шакина «Особенности иммунного ответа и метаболические изменения лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующим обструктивным бронхитом» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 597-604. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-597-604

© Куртасова Л.М., Шакина Н.А., 2017

For citation:
L.M. Kurtasova, N.A. Shakina "Features of immune response and metabolic changes in lymphocytes from peripheral blood in younger children with recurrent obstructive bronchitis ", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 597-604. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-597-604

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-597-604

FEATURES OF IMMUNE RESPONSE AND METABOLIC CHANGES IN LYMPHOCYTES FROM PERIPHERAL BLOOD IN YOUNGER CHILDREN WITH RECURRENT OBSTRUCTIVE BRONCHITIS

Kurtasova L.M.[a], Shakina N.A.[b]

[a] *V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation*
[b] *Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Abstract. The aim of the work was to study the parameters of T-cells, humoral immunity and activity of NAD(P)- dependent dehydrogenases in lymphocytes from peripheral blood at young children with recurrent obstructive bronchitis (ROB). Patients and Methods: Fifty-four children at the age of 1-3 years with ROB were observed. The control group consisted of 35 healthy children at similar age. The numbers of $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ cells in peripheral blood were determined by flow cytofluorimetric technique. IgA, IgM, and IgG concentrations in blood serum were evaluated by G. Mancini et al. (1965); circulating immune complexes (CIC), by V. Haskova et al. (1978); total IgE test was performed with "Total IgE – IFA Best" system (Russia). Relative activity of NAD (P)-dependent dehydrogenase in peripheral blood lymphocytes was studied according to A. Savchenko et al.(1989). The results of this study have revealed changed phenotypic spectrum of peripheral blood lymphocyte populations; a statistically significant reduction in IgA concentration, and a tendency for increased IgE levels in blood serum in the children with ROB. An increase of ribose-5-phosphate- and NADP-dependent metabolic processes; reduced lactate dehydrogenase anaerobic reactions; a switch from lipid catabolism products to glycolysis; a shunt role of malate/aspartate in cell energy supply, and for glutathione reductase activity; elevated levels of substrate flow along Krebs cycle in peripheral blood lymphocytes were registered as well.

It may be concluded that the change of phenotype and enzymatic activity of blood lymphocytes, selective IgA deficiency in blood serum could be shown in the younger children with recurrent obstructive bronchitis.

Keywords: bronchial obstruction, bronchitis, recurrent, lymphocyte, phenotype, immunoglobulins, metabolism

Исследование выполнено при финансовой поддержке КГАУЗ «Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД».

Введение

Заболевания органов дыхания по-прежнему остаются самой распространенной патологией у детей раннего возраста. Проблема борьбы с ними является одной из самых актуальных проблем педиатрии и практического здравоохранения.

В структуре бронхолегочной патологии среди заболеваний нижних дыхательных путей у детей раннего возраста лидирующие позиции занимает бронхит, который может проявляться обструктивным синдромом и сопровождаться рецидивами [5]. Согласно современным эпидемиологическим исследованиям, установлена тесная связь бронхита с вирусной инфекцией [1, 5].

Органы дыхания особенно уязвимы для вирусного поражения у детей раннего возраста из-за относительно низкой воздушной проводимости и несостоятельности местной и общей противоинфекционной защиты. Вирусная инфекция способна также усугублять воздействие на бронхолегочную систему обычных аэрополлютантов [6]. Частые респираторные вирусные инфекции могут приводить к деструкции эпителия дыхательных путей и усилению гипериммунной реакции с избыточным воспалительным компонентом [2].

Известно, что иммунная система – одна из важнейших гомеостатических систем организма – участвует практически во всех адаптивных реакциях. Лимфоциты, несущие рецепторы ко всем основным биологическим регуляторным веществам, отражают в известной степени общую направленность регуляторных процессов целостного организма. В то же время именно в клетке начинается формирование ответных реакций на внешнее воздействие, что позволяет составить представление об иммунологической стратегии, избранной организмом.

При этом метаболизм клетки – основа любого проявления ее жизнедеятельности, в связи с чем метаболические параметры не могут не отражать ее функциональные возможности [4].

Очевидно, что в качестве критерия оценки метаболической ситуации в иммунокомпетентных клетках не может быть взят какой-то один, тем более гомеостазированный, показатель.

Особенно высокой информативностью для исследования метаболизма лимфоцитов, основного структурно-функционального элемента иммунной системы, обладают окислительно-восстановительные ферменты. Это связано с тем, что, являясь основными переносчиками электронов в клетке, они осуществляют ключевые реакции клеточного метаболизма и участвуют в направленной координации сопряженных метаболических потоков [4].

В связи с вышеизложенным **целью исследования** явилось изучение параметров Т-клеточного и гуморального иммунитета, активности НАД- и НАДФ-зависимых дегидрогеназ лимфоцитов периферической крови у детей раннего возраста с рецидивирующим обструктивным бронхитом.

Материалы и методы

Проведено открытое клиническое исследование.

Критериями включения в исследование являлись: возраст 1-3 года; европеоидная раса; бронхит с бронхообструктивным синдромом, рецидивирующее течение; отсутствие хронических очагов инфекции; отсутствие терапии в течение месяца, предшествующего обследованию.

Критерии исключения из исследования:

– простой бронхит;

– бронхиальная астма;

– наличие сопутствующих заболеваний (наследственных и врожденных).

Исследования проводили на базе Красноярского краевого Центра профилактики и борьбы со СПИД. Обследовано 54 ребенка в возрасте от одного года до трех лет (средний возраст 2,09±0,83 года), из них 30 (55,56%) мальчиков и 24 девочки (44,44%). Диагноз: обструктивный бронхит, рецидивирующее течение, был верифицирован на основании жалоб, клинической картины (кашель спастического характера, повышение температуры, затрудненное дыхание с удлиненным продолжительным выдохом, перкуторно легочный звук с коробочным оттенком, при аускультации жесткое дыхание, нарушение фаз дыхательного цикла с преобладанием фазы выдоха, сухие рассеянные, свистящие хрипы) и рентгенологического обследования органов грудной клетки (отсутствие очаговых и инфильтративных теней, эмфизематозность легочных полей). У наблюдаемых детей отмечалось до 3 эпизодов бронхообструктивного синдрома на фоне острой респираторной инфекции. Сенсибилизации к пищевым, бытовым, эпидермальным и пыльцевым аллергенам не обнаружено. В назоцитограммах среди клеточных элементов превалировали лимфоциты, содержание эозинофилов – 0-1-2 в поле зрения.

Контрольную группу составили 35 здоровых детей в возрасте 1-3 лет (средний возраст 2,14±0,84 года), из них 19 (54,29%) мальчиков и 16 (45,71%) девочек.

Мононуклеары выделяли из цельной гепаринизированной крови центрифугированием в градиенте плотности фиколл-верографина ($\rho = 1{,}077$ г/см^3) по методу A. Boyum [7].

При контроле морфологического состава лейкоцитарной взвеси определялась чистота выхода лимфоцитов, составляющая не менее 97%. Для биолюминесцентного анализа использовали 1 млн выделенных лимфоцитов.

Суспензию выделенных лимфоцитов, содержащую клетки в концентрации 1 млн/мл, после однократного замораживания-размораживания дополнительно разрушали путем осмотического лизиса с добавлением 2,0 мМ дитиотреитола. Затем осуществляли биолюминесцентное определение активности глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (Г6ФДГ, КФ1.1.1.49), глицерол-3-фосфатдегидрогеназы (Г3ФДГ, КФ1.1.1.8, НАД- и НАДФН-зависимой лактатдегидрогеназы (НАДЛДГ, НАДНЛДГ, КФ1.1.1.27), НАД- и НАДН-зависимой малатдегидрогеназы (НАДМДГ, НАДНМДГ, КФ1.1.1.37), НАД- и НАДН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДГДГ, НАДНГДГ, КФ 1.4.1.2), НАДФ- и НАДФН-зависимой глутаматдегидрогеназы (НАДФГДГ, НАДФНГДГ, КФ1.4.1.4), НАД-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДИЦДГ, КФ 1.1.1.41) НАДФ-зависимой изоцитратдегидрогеназы (НАДФИЦДГ, КФ1.1.1.42), малатдегидрогеназы декарбоксилирующей (НАДФМДГ, КФ1.1.1.40) и глутатионредуктазы (ГР, КФ1.6.4.2). Активность НАДЛДГ, НАДМДГ, НАДГДГ, НАДФГДГ определяли как по прямым, так и по обратным реакциям (НАДНЛДГ, НАДНМДГ, НАДНГДГ, НАДФНГДГ соответственно). Для этого к 150 мкл инкубационной смеси разрушенных лимфоцитов (концентрация субстратов и кофакторов), а также pH среды соответствуют величинам, указанным в используемой нами методике А.А. Савченко, Л.Н. Сунцовой [3].

В инкубационную смесь для определения активности НАДФИЦДГ и НАДИЦДГ дополнительно добавляли аденозинфосфат (Applichem GMBH, Германия) в концентрациях 2,15 и 1,3 мМ соответственно). В среду инкубации для определения уровней НАДНГДГ и НАДФНГДГ дополнительно вносили NH4Cl (Sigma,США) в концентрации 5,0 мМ, а для определения ГР-ЭДТА (Sigma,США) в концентрации 0,5 мМ. После инкубации исследуемых проб при 37 °С

в течение 30 мин (для ферментативных реакций с восстановленным НАД(Ф)+) или 5 мин (для реакций с окислением НАД(Ф)Н) к 200 мкл инкубационной смеси добавляли 50 мкл флавинмононуклеотида (FMN, Applichem GMBH, Германия) в концентрации $1,5 \times 10^{-5}$ М, 50 мкл 0,0005% миристинового альдегида (Sigma, США) и 10 мкл ферментативной системы НАД(Ф)Н:FMN оксидоредуктаза-люцифераза (все реактивы биолюминесцентной системы разведены в 0,1М K^+, NA^+-фосфатном буфере (Реахим, Россия) с pH 7,0. Ферментативная система НАД(Ф)Н:FMN оксидоредуктаза-люцифераза изготовлена из очищенных методами ионообменной хроматографии и гель-фильтрации люциферазы из *Photobacterium legionathi* и оксиредуктазы из *Vibrio fischeri* в Институте биофизики СО РАН, г. Красноярск.

После смешивания биолюминесцентных реактивов и инкубационной пробы с помощью биолюминометра «БЛМ-8801» (Россия) осуществляли измерение свечения. Активность исследуемых оксидоредуктаз выражали в ферментативных единицах (1Е = 1мкмоль/мин) на 10^4 клеток. Для проведения биолюминесцентного анализа также использовали глюкозо-6-фосфат, глицерол-3-фосфат, лактат, малат (Sigma, США), глутамат, изоцитрат, 2-оксоглутарат, пируват, оксалоацетат (ICN Biomedicals Inc., США), глутатион окисленный, $НАД^+$, НАДФ, НАДН и НАДФН (Applichem GMBH, Германия).

Методом проточной цитофлуориметрии с использованием прибора "FACS Callibur" (Becton Dickinson, США) и реагентов "Simultesf IMK-lymphocyte Kit" (США) определяли содержание $CD3^+$, $CD4^+$, $CD8^+$, $CD19^+$ клеток в периферической крови.

Концентрацию иммуноглобулинов классов A, M, G в сыворотке крови оценивали методом радиальной иммунодиффузии в геле [13]. Содержание циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) в сыворотке крови исследовали в реакции с полиэтиленгликолем [10]. Концентрацию иммуноглобулинов класса Е в сыворотке крови определяли методом иммуноферментного анализа тест-системой «IgE общий-ИФА –Бест» (Россия).

Исследование одобрено Локальным этическим комитетом Красноярского государственного медицинского университета им. проф. В.Ф. Войно-Ясенецкого (протокол № 23/2011 от 02 апреля 2011 г.).

Статистический анализ

Статистическая обработка данных проводилась с использованием программы Statistica v. 6.0 (StatSoft Ins., США).

Нормальность распределения показателей определялась с помощью метода Колмогорова–Смирнова. Количественные показатели, учитывая нормальное распределение, описывались с использованием средних арифметических значений (M) и стандартной ошибки среднего (±m). Для изучения статистической значимости различий между количественными признаками представленных групп применяли t-критерий Стьюдента. Критический уровень значимости (p) при проверке статистических гипотез принимали равным 0,05. При этом значение p могли ранжировать по трем уровням достигнутых статически значимых различий: $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$.

Результаты

Анализ полученных данных выявил в группе детей с РОБ выраженную тенденцию к повышению количества лейкоцитов и статистически значимое увеличение абсолютного числа лимфоцитов периферической крови по сравнению с параметрами контрольной группы (табл. 1).

При изучении фенотипического спектра лимфоцитов периферической крови в исследуемой группе детей с РОБ обнаружили статистически значимое увеличение абсолютного числа зрелых Т-лимфоцитов ($CD3^+$) и $CD8^+$ клеток, а также на фоне процентного снижения количества CD_4^+ клеток выраженную тенденцию к повышению процентного содержания $CD8^+$ клеток в периферической крови относительно показателей группы контроля (табл. 1). Абсолютное и относительное количество В-лимфоцитов в периферической крови в группе детей с РОБ статистически значимо не отличалось от аналогичных показателей контрольной группы (табл. 1).

Реакция гуморального звена иммунитета характеризовалась снижением в 1,47 раза ($p < 0,001$) концентрации иммуноглобулинов класса А и тенденцией к повышению уровня общих IgE в сыворотке крови в группе больных с РОБ ($0,1 > p > 0,05$) по сравнению с параметрами контроля (табл. 1).

Результаты исследования активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови установили повышение активности Г6ФДГ в группе детей с РОБ относительно контрольных значений (рис. 1В).

Изучение активности исследуемых оксидоредуктаз митохондриального компартмента лимфоцитов крови позволило констатировать в группе детей с РОБ статистически значимое увеличение активности НАДИЦДГ и НАДМДГ, а также вспомогательной реакции НАДФИЦДГ на фоне снижения в 6,07 раза ($p < 0,001$) уровня активности малик – фермента (рис. 1Б, В). Следует отметить повышение активности НАДГДГ по прямой и снижение НАДГДГ и НАДФГДГ по обратной реакциям по сравнению с показателями контрольной группы (рис. 1А).

ТАБЛИЦА 1. ИММУНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ У ДЕТЕЙ С РЕЦИДИВИРУЮЩИМ ОБСТРУКТИВНЫМ БРОНХИТОМ (M±m)

TABLE 1. IMMUNOLOGICAL INDEXEX FOR CHILDREN WITH A RECRUDESCENT OBSTRUCTIVE BRONCHITIS (M±m)

Показатель Index	**Контрольная группа** Control group **(n = 35)**	**Больные дети** Sick children **(n = 54)**	**p**
Лейкоциты, 10^9/л Leucocytes, 10^9/L	8,42±0,15	9,64±0,67	0,1 > p > 0,05
Лимфоциты, % Lymphocytes, %	45,10±1,49	49,30±2,84	
Лимфоциты, 10^9/л Lymphocytes, 10^9/L	3,43±0,11	4,74±0,40	< 0,002
$CD3^+$ клетки, % $CD3^+$ cell, %	61,90±2,11	59,61±1,52	
$CD3^+$ клетки, 10^9/л $CD3^+$ cell, 10^9/L	2,10±0,05	2,80±0,25	< 0,01
$CD4^+$ клетки, % $CD4^+$ cell, %	36,07±1,94	29,32±0,88	< 0,01
$CD4^+$ клетки, 10^9/л $CD4^+$ cell, 10^9/L	1,52±0,07	1,71±0,14	
$CD8^+$ клетки, % $CD8^+$ cell, %	16,21±1,35	20,40±2,11	0,1 > p > 0,05
$CD8^+$ клеток, 10^9/л $CD8^+$ cell, 10^9/L	0,54±0,04	0,93±0,12	p < 0,01
$CD4^+$/CD8	2,92±0,19	2,26±0,25	p < 0,05
$CD19^+$ клетки, % $CD19^+$ cell, %	11,45±1,13	12,00±1,21	
$CD19^+$ клетки, 10^9/л $CD19^+$ cell, 10^9/L	0,38±0,04	0,47±0,04	
IgA, г/л IgA, g/l	0,87±0,06	0,59±0,04	< 0,001
IgM, г/л IgM, g/l	0,62±0,05	0,71±0,04	
IgG, г/л IgG, g/l	6,95±0,49	7,24±0,46	
IgE, МЕ/мл IgE, ME/ml	17,45±1,68	23,16±2,38	0,1 > p > 0,05
ЦИК, о.е. CIC, s.u.	42,06±2,32	45,50±4,71	

Примечание. p – статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

Note. p, statistically meaningful distinctions with the indexes of control group.

Кроме того, в группе детей с РОБ в лимфоцитах периферической крови снижена анаэробная реакция ЛДГ, а также в 5,82 раза ($p < 0,001$) активность Г3ФДГ, в 13,17 раза ($p < 0,001$) НАДНМДГ и в 7,23 раза ($p < 0,001$) понижается уровень ГР относительно контрольных параметров (рис. 1Б, В).

Обсуждение

Исследуемые нами ферменты занимают ключевые позиции на разных метаболических путях клетки. Так, снижение активности анаэробной реакции ЛДГ и НАДН-зависимой реакции МДГ в лимфоцитах крови в группе детей с РОБ может отражать низкую активность анаэробного окисления глюкозы и, соответственно, пониженный уровень наработки НАДН в гликолизе. Снижение интенсивности анаэробного окисления глюкозы может быть компенсировано повышением активности Г3ФДГ-фермента, осуществляющего перенос продуктов липидного катаболизма на окислительно-восстановительные реакции гликолиза [8]. Однако активность данного энзима в лимфоцитах периферической крови в группе детей с РОБ значительно снижена.

Состояние митохондриального компартмента лимфоцитов периферической крови в группе детей с РОБ характеризуется повышением уровня

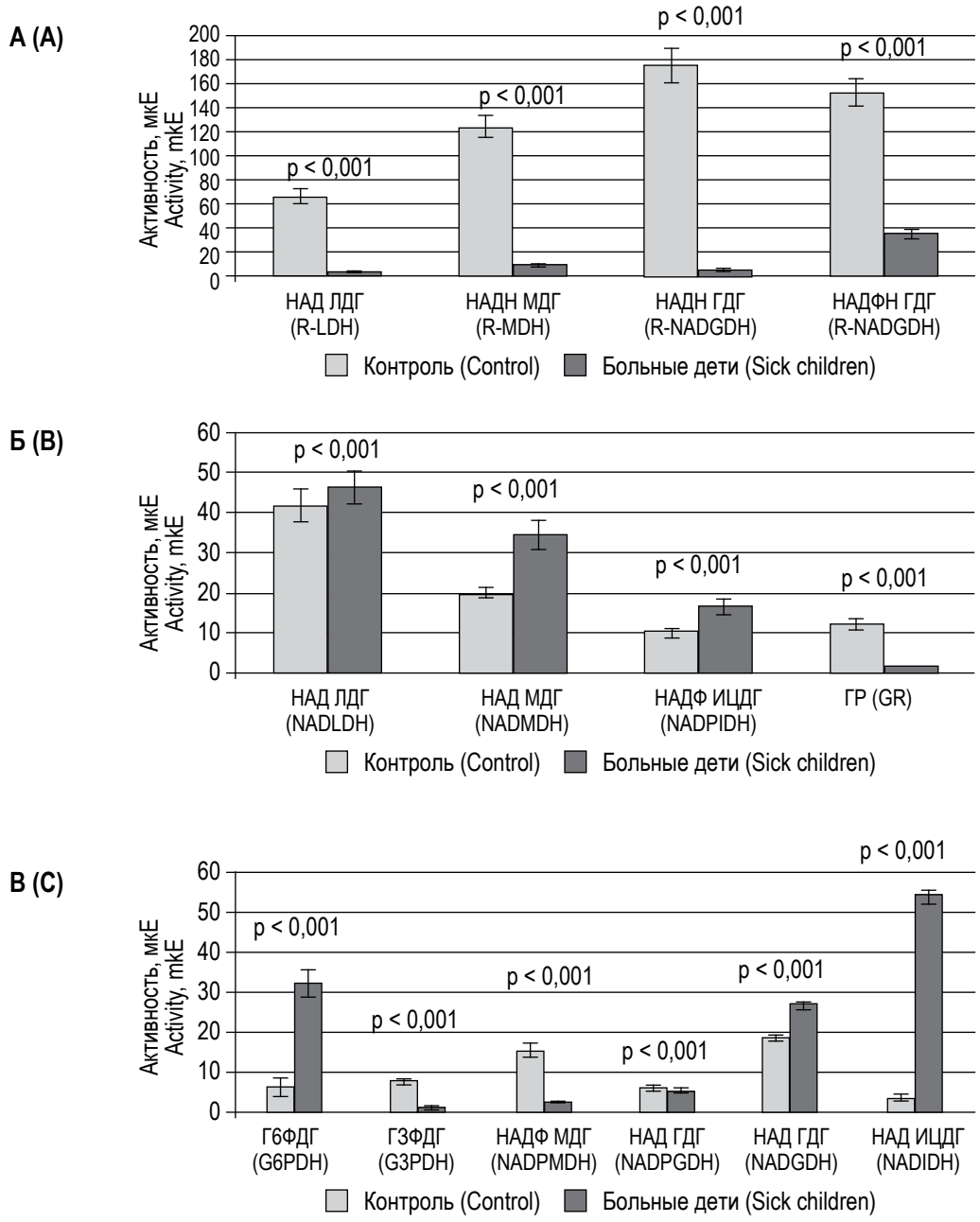

Рисунок 1. Показатели активности НАД(Ф)-зависимых дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови у детей с рецидивирующим обструктивным бронхитом

Примечание. p – статистически значимые различия с показателями контрольной группы.

Figure 1. Activity of NAD (P)-dependent dehydrogenases from peripheral blood lymphocytes in children with recurrent obstructive bronchitis

Note. p, statistically significant differences from the control group.

НАДМДГ, НАДИЦДГ и НАДФИЦДГ, что отражает увеличение субстратного потока как на начальных реакциях, так и терминальных стадиях цикла Кребса.

Необходимо отметить в лимфоцитах крови в группе детей с РОБ повышение активности НАДГДГ, что свидетельствует о субстратной стимуляции лимонного цикла продуктами реакций аминокислотного обмена [12, 15].

В то же время отмечается пониженная активность НАДНГДГ и НАДФНГДГ в лимфоцитах периферической крови в группе больных с РОБ. По-видимому, высокая интенсивность работы дыхательной цепи и НАД-зависимых дегидрогеназ цикла трикарбоновых кислот ограничивают возможность использования НАДНГДГ и НАДФНГДГ для стимуляции реакций аминокислотного обмена.

В лимфоцитах периферической крови в группе детей с РОБ наблюдается повышение активности Г6ФДГ, характеризующее интенсификацию пластических процессов, зависящих от продуктов пентозофосфастного цикла [14, 16]. При этом увеличение оттока интермедиатов на реакции пластического обмена вызывает снижение интенсивности субстратного потока по гликолизу, что выражается в пониженном уровне анаэробной реакции ЛДГ в лимфоцитах крови в группе детей с РОБ.

Кроме того, в лимфоцитах крови в группе детей с РОБ отмечается низкая активность маликфермента (НАДФМДГ). Роль данного фермента в клеточном метаболизме определяется, прежде всего, восстановлением НАДФ до НАДФН, который затем используется в синтетических клеточных процессах [11, 18]. Снижение активности НАДФМДГ может приводить к недостаточному образованию восстановительной формы цитоплазматического НАДФН и недостатку субстратов для биосинтеза жирных кислот, а это может определять снижение реакций липидного обмена в клетке. В связи с этим можно заключить, что если на уровень митохондриального обмена в лимфоцитах крови в группе детей с РОБ сниженная активность малик-фермента не оказывает значимого влияния, то ингибирование Г3ФДГ может быть связано с понижением реакций липидного анаболизма.

Глутатионредуктаза осуществляет восстановление глутатиона за счет окисления НАДФН, что определяет его функциональную важность в реакциях глутатион-зависимой антиоксидантной системы [9, 17]. Сниженная активность ГР в лимфоцитах периферической крови в группе детей с РОБ может привести к снижению антиоксидантной защиты клетки.

Следовательно, у детей с РОБ в период клинической ремиссии сохраняются метаболические нарушения в лимфоцитах крови, что, учитывая, высокую значимость метаболических реакций для функциональной активности клетки, может явиться одной из возможных причин, способствующих рецидиву заболевания. Данное обстоятельство диктует необходимость проведения метаболической реабилитации, направленной на восстановление внутриклеточных обменных процессов в клетках иммунной системы.

Заключение

Результаты проведенного исследования выявили у детей с РОБ на фоне увеличения абсолютного числа лимфоцитов периферической крови изменения их фенотипического спектра, а также снижение уровня IgA и тенденцию к повышению концентрации IgE в сыворотке крови.

Полученные нами данные обнаружили в лимфоцитах периферической крови у детей с РОБ повышенный отток субстратов через Г6ФДГ на пластические процессы и снижение интенсивности реакций гликолиза на терминальных стадиях, а также понижение субстратного питания за счет продуктов липидного обмена.

В лимфоцитах периферической крови у детей с РОБ наблюдается высокий уровень субстратного потока по циклу Кребса, вносящему наибольший вклад в процессы клеточного энергообразования. В то же время определяется значительное снижение оттока субстратов через НАДНГДГ и НАДФНГДГ с цикла трикарбоновых кислот на реакции аминокислотного обмена. Кроме того, установлено снижение активности глутатионредуктазы, что может способствовать повышению интенсивности перекисных процессов в клетке.

Конфликт интересов

Авторы статьи подтверждают отсутствие финансовой поддержки/конфликта интересов, о которых необходимо сообщить.

Список литературы / References

1. Борисенко Г.Н., Носуля Е.В., Никулин И.В. Клинико-эпидемиологические аспекты заболевания верхних дыхательных путей у детей с рецидивирующей респираторной инфекцией // Российская ринология, 2012. Т. 22, № 4. С. 38-42. [Borisenko G.N., Nosulya E.V., Nikulin I.V. Upper respiratory tract diseases in children with recurrent respiratory infection. *Rossiyskaya rinologiya = Russian Rhinology, 2012, Vol. 22, no. 4, pp. 38-42.* (In Russ.)]

2. Караулов А.В. Иммуномодуляция при респираторных инфекциях: от понимания целей и механизмов действия к клинической эффективности // Детские инфекции, 2012. № 3. С. 62-64. [Karaulov A.V. Immunomodulation in therapy of respiratory infections: from understanding of the goals and mechanisms of action to clinical efficiency. *Detskie infektsii = Children's Infections, 2012, no. 3, pp. 62-64.* (In Russ.)]

3. Савченко А.А., Сунцова Л.Н. Высокочувствительное определение активности дегидрогеназ в лимфоцитах периферической крови биолюминесцентным методом // Лабораторное дело, 1989. № 11. С. 23-25. [Savchenko A.A., Suntsova L.N. Higly sensitive determination of the dehydrogenase activity in peripheral bloodlymphocytes using a bioluminescent method. *Laboratornoe delo = Laboratory Case, 1989, no. 11, pp. 23-25.* (In Russ.)]

4. Савченко А.А., Борисов А.Г. Основы клинической иммунометаболомики. Новосибирск: Наука, 2012. 263 с. [Savchenko A.A., Borisov A.G. Basis of the Clinical immunometabolomic]. Novosibirsk: Science, 2012. 263 p.

5. Сорока Н.Д. Острый бронхит у детей: состояние проблемы, актуальные пути решения // Педиатрия, 2013. Т. 92, № 6. С. 106-114. [Soroka N.D. Acute bronchitis in children: the problem, actual solutions. *Pediatriya = Pediatrics, 2013, Vol. 92, no. 6, pp. 106-114.* (In Russ.)]

6. Юренев Г.Л., Юренева-Тхоржевская Т.В. Бронхообструктивный синдром при острых респираторных вирусных инфекциях: причины и последствия // Практическая пульмонология, 2014. № 1. С. 1-7. [Yurenev G.L., Yureneva-Thorzhevskaya T.V. Bronchial obstruction syndrome with acute respiratory virus infections: the causes and consequences. *Prakticheskaya pulmonologiya = Practical Pulmonology, 2014, no. 1, pp. 1-7.* (In Russ.)]

7. Boyum A. Isolation of lymphocytes from blood and bone marrow. *Scand. Clin. Lab. Invest, 1968, Vol. 21, no. 97, pp. 77-80.*

8. DeLa Roche M., Tessier S.N., Storey K.B. Structural and functional properties of glycerol-3-phosphate degydrogenase from a mammalian hibernator. *Protein J., 2012, Vol. 31, no. 2, pp. 109-119.*

9. Diukic M.M., Jovanovic M.D., Ninkovic M., Stevanovic I., Ilic K. Curcic M., Vekic J. Protective role of glutatione reductase in paraquat induced neurotoxicity. *Chem. Biol. Interact., 2012, Vol. 199, no. 2, pp. 74-86.*

10. Haskova V., Kaslik J., Rina J., Rovensky J. Simple method of circulating immune complex detection in human sera by polyethylene glycol precipitation. *J. Immunol., 1978, Vol. 154, pp. 399-406.*

11. Hsieh J.Y., Chen S.H., Hung H.C. Functional roles of the tetramer organization of malic enzyme. *J. Biol. Chem., 2009, Vol. 284, no. 27, pp. 18096-18105.*

12. Li M., Li C., Allen A., Stanley C.A., Smith T.J. The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys., 2012, Vol. 519, no. 2, pp. 69-80.*

13. Mancini G., Carbanaro A.O., Haremans J.F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial diffusion. *Immunochemistry, 1965, Vol. 2, no. 3, pp. 235-255.*

14. Norris M.G., Malys N. What is the true enzyme kinetics in the biological system? An investigation of macromolecular crowding effect upon enzyme kinetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun, 2011, Vol. 405, no. 3, pp. 388-392.*

15. Spanaki C., Plaitakis A. The role of glutamate dehydrogenase in mammalian ammonia metabolism. *Neurotox. Res, 2012, Vol. 21, no. 1, pp. 117-127.*

16. Stanton R.C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life, 2012, Vol. 64, no. 5, pp. 362-369.*

17. Tandogan B., Sengezer C., Ulusu N.N. In vitro effects of imatinib on glucose-6-phophate degydrogenase and glutathione reductase. *Folia Biol. (Praha), 2011, Vol. 57, no. 2, pp. 57-64.*

18. Wand B., Wang P., Zhend E., Chen X., Zhao H., Song P., Su R., Li X., Zhu G. Biochemical properties and physiological roles of NADP – dependent malic enzyme in *Escherichia coli. J. Microbiol, 2012, Vol. 49, no. 5, pp. 797-802.*

Авторы:

Куртасова Л.М. *– д.м.н., профессор кафедры клинической иммунологии ФГБОУ ВО «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения РФ, г. Красноярск, Россия*

Шакина Н.А. *– к.м.н., врач клинической лабораторной диагностики лаборатории иммунологических и гематологических исследований КГАУЗ « Красноярский краевой центр профилактики и борьбы со СПИД», г. Красноярск, Россия*

Authors:

Kurtasova L.M.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Department of Clinical Immunology, V.F. Voino-Yasenetsky State Medical University, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Shakina N.A.*, PhD (Medicine), Doctor, Laboratory of Immunological and Haematological Research, Krasnoyarsk Regional Center for Prevention and Control of AIDS, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Поступила 22.02.2017
Принята к печати 14.03.2017

Received 22.02.2017
Accepted 14.03.2017

ГЕНЫ ЦИТОКИНОВ КАК ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МАРКЕРЫ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ С КОНТРОЛИРУЕМЫМ И НЕКОНТРОЛИРУЕМЫМ ТЕЧЕНИЕМ

Смольникова М.В.[1], Фрейдин М.Б.[2, 3], Смирнова С.В.[1]

[1] Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

[2] Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия

[3] Отдел близнецовых исследований и генетической эпидемиологии, Королевский колледж Лондона, Лондон, Великобритания

Резюме. Атопическая бронхиальная астма (АБА) является многофакторным заболеванием и ее развитие зависит как от множества факторов окружающей среды, так и генетической компоненты. Генетические факторы риска развития АБА могут влиять на фенотип заболевания и степень контроля его течения. Существенный вклад в патогенез АБА вносят гены цитокинов, участвующие в иммунном ответе, развитии и активации воспаления дыхательных путей. Предполагается, что степень контроля заболевания является генно-опосредованным процессом и во многом зависит от наличия того или иного аллельного варианта в генах медиаторов, участвующих в патогенезе АБА. Знания о генетических маркерах позволит прогнозировать течение атопической бронхиальной астмы у детей.

Исследование проведено для оценки ассоциации генов провоспалительных и противовоспалительных цитокинов с уровнем контроля течения атопической бронхиальной астмы (АБА).

У больных детей с контролируемым (КАБА) и неконтролируемым (НАБА) течением заболевания (n = 110), а также в популяционной выборке (n = 138) изучены 11 полиморфизмов генов *IL2* (rs2069762), *IL4* (rs2070874 и rs2243250), *IL5* (rs2069812), *IL10* (rs1800872 и rs1800896), *IL12B* (rs3212227), *TNFA* (rs1800629 и rs1800630), *TGFB1* (rs1800469), *IFNG* (rs2069705), кодирующих цитокины, принимающие активное участие в развитии и регуляции аллергического воспаления.

По данным проведенного исследования, у европеоидов Восточной Сибири частоты аллелей и генотипов по изученным полиморфизмам соответствуют таковым в других европеоидных популяциях мира. Получены статистически значимые отличия между группой НАБА и контрольной выборкой по частотам генотипов *IL2* (rs2069762): генотип GG чаще встречается в контрольной группе (14,1% по сравнению с 5,9% в группе НАБА, p = 0,03). Показано, что аллель *IL2*T* или генотип TT (rs2069762) предрасполагает к развитию неконтролируемого течения АБА. При сравнении гаплотипов *IL4* (rs2070874 и rs2243250) с поправкой на пол и возраст, с использованием аддитивной модели наследования, показано, что наиболее часто встречающийся гаплотип CC (частота в группах АБА/

Адрес для переписки:
Смольникова Марина Викторовна
Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», «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.
Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North
660022, Russian Federation, Krasnoyarsk,
P. Zheleznyak str., 3g.
Phone/Fax: 7 (391) 228-06-83.
E-mail: smarinv@yandex.ru

Образец цитирования:
М.В. Смольникова, М.Б. Фрейдин, С.В. Смирнова «Гены цитокинов как генетические маркеры атопической бронхиальной астмы с контролируемым и неконтролируемым течением» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 605-614.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614

© Смольникова М.В. и соавт., 2017

For citation:
M.V. Smolnikova, M.B. Freidin, S.V. Smirnova "Cytokine genes as genetic markers of controlled and uncontrolled atopic bronchial asthma", Medical Immunology (Russia)/ Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 605-614.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-605-614

КАБА/НАБА составляет 0,75/0,76/0,74 соответственно) является протективным в отношении риска развития атопической бронхиальной астмы (RR 0,53; SE 0,32; p = 0,0439). Сравнительный анализ гаплотипов *TNFA* (rs1800629 и rs1800630) с поправкой на пол и возраст, с использованием аддитивной модели наследования, показал, что гаплотип GC является протективным в отношении риска развития АБА (RR 0,59±0,17; p = 0,0028), а гаплотип GA – предрасполагающим к заболеванию (RR 2,07±0,25; p = 0,0034). Это характерно для атопической бронхиальной астмы вне зависимости от степени контроля заболевания (КАБА GA: RR 1,93±1,2; p = 0,0414; НАБА GA: RR 2,43±0,31; p = 0,0051).

Установлено, что гены цитокинов вносят вклад в развитие АБА у детей. Эти данные для европеоидной популяции Восточной Сибири получены впервые и представляют интерес с точки зрения пополнения данных о вкладе полиморфизма генов цитокинов в развитие атопической бронхиальной астмы и контроля течения заболевания у детей.

Ключевые слова: атопия, воспаление, бронхиальная астма, цитокины, полиморфизм генов, контроль заболевания

CYTOKINE GENES AS GENETIC MARKERS OF CONTROLLED AND UNCONTROLLED ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA

Smolnikova M.V.[a], Freidin M.B.[b, c], Smirnova S.V.[a]

[a] *Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation*

[b] *Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation*

[c] *Department of Twin Research and Genetic Epidemiology, King's College London, London, United Kingdom*

Abstract. Atopic bronchial asthma (ABA) is a multifactorial disease; its development is dependent on many environmental and genetic factors. Genetic risk factors can affect the clinical phenotype of ABA and the level of therapeutic control over the disease. Cytokine genes are crucially important in pathogenesis of ABA as they encode proteins participating in immune response and development of inflammation in bronchi. It was suggested that the therapeutic control of the disease is genetically mediated and depends on the presence of one or another allele in genes of mediators, participating in ABA pathogenesis. The knowledge about genetic markers will allow to predict clinical course of ABA in children.

We carried out the analysis of association between genes of pro- and anti-inflammatory cytokines with the level of therapeutic control of ABA. In children with controlled and uncontrolled ABA (CABA and UABA, respectively; n = 110), and in general a population sample (n = 138), we analysed 11 polymorphisms: *IL2* (rs2069762), *IL4* (rs2070874 и rs2243250), *IL5* (rs2069812), *IL10* (rs1800872 and rs1800896), *IL12B* (rs3212227), *TNFA* (rs1800629 and rs1800630), *TGFB1* (rs1800469), and *IFNG* (rs2069705), encoding cytokines actively participating at the development of allergic inflammation.

According to results of present study, the prevalence of alleles and genotypes of the analysed loci in the East Siberia Caucasians is consistent with the data in other world Caucasian populations. We have found statistically significant differences between UABA and control groups for the prevalence of *IL2* (rs2069762) polymorphism: GG genotype was more common in control group (14.1% compared to 5.9%, p = 0.03). It was shown that the *IL2*T* allele and TT genotype of the rs2069762 are associated with the increased risk of uncontrolled ABA. A comparison of the haplotypes of *IL4* (rs2070874 and rs2243250) gene with correction for sex and age within an additive model revealed that the most common haplotype CC (prevalence in ABA/CABA/UABA groups is 0.75/0.76/0.74, respectively) is protective against the development of ABA (RR 0.53±0.32; p = 0.044). A comparative analysis of *TNFA* (rs1800629 and rs1800630) haplotypes has shown the GC haplotype to be protective against the risk of ABA (RR 0.59±0.17; p = 0.003) while the GA haplotype is positively associated with the disease (RR 2.07±0.25; p = 0.003). This was true for BA, regardless of the control over the disease (CABA GA: RR 1.93±1.2; p = 0.041; UABA GA: RR 2.43±0.31; p = 0.005).

Thus, it was established that the studied cytokine genes are important for the development of ABA in children. These data were obtained for the first time for Caucasians of East Siberia. They are of interest in terms of accumulation of the data about the impact of cytokine genes polymorphism upon development of ABA and its therapeutic control in children.

Keywords: atopy, inflammation, bronchial asthma, cytokines, gene polymorphism, disease control

Введение

Атопическая бронхиальная астма (АБА) – одно из самых распространенных и изучаемых заболеваний в мире, в основе патогенеза которого лежит воспалительный процесс в бронхах. По данным Всемирной организации здравоохранения, около 235 миллионов человек во всем мире страдают АБА. Бронхиальная астма может развиваться в любом возрасте, но в большинстве случаев первые симптомы возникают в детском возрасте [5, 20]. До настоящего времени бронхиальная астма считается неизлечимым заболеванием, неконтролируемое течение которого приводит к инвалидизации больного.

АБА является многофакторным заболеванием и ее развитие зависит как от множества факторов окружающей среды, так и генетической компоненты. Генетические факторы риска развития АБА могут влиять на фенотип заболевания и степень контроля его течения. Существенный вклад в патогенез АБА вносят гены, участвующие в иммунном ответе, развитии и активации воспаления дыхательных путей [1, 5]. В частности, гены цитокинов способствуют реализации различных патогенетических аспектов АБА – непосредственно или через межгенные взаимодействия, определяя степень контроля над заболеванием. Вариация уровня экспрессии генов и продукции цитокинов, обусловленная тем или иным полиморфизмом в кодирующей или промоторной части гена, может определять персонифицированный подход к терапии.

Предполагается, что степень контроля заболевания является генно-опосредованным процессом и во многом зависит от наличия того или иного аллельного варианта в генах медиаторов, участвующих в патогенезе АБА. Знания о генетических маркерах позволит прогнозировать течение атопической бронхиальной астмы у детей.

ТАБЛИЦА 1. СТРУКТУРА ПРАЙМЕРОВ И ПАРАМЕТРЫ АМПЛИФИКАЦИИ И РЕСТРИКЦИИ ДЛЯ ИЗУЧЕННЫХ ПОЛИМОРФИЗМОВ

TABLE 1. SEQUENCE OF PRIMERS, PARAMETERS OF DNA AMPLIFICATION, AND RESTRICTION FOR THE GENE POLYMORPHISMS STUDIED

Ген Gene	**Полиморфизм (SNP)** Polymorphism (SNP)	**Структура праймеров** Sequence of primers	**Температура отжига, °С** Annealing temperature, °C	**Эндонуклеаза рестрикции** Restriction enzyme
IL2	T-330G rs2069762	5’-tattcacatgttcagtgtagttct-3’ 5’-acattagcccacacttaggt-3’	48	Bfa I*
IL4	C-590T rs2243250	5’-cacctaaacttgggagaacatggt-3’ 5’-gttgtaatgcagtcctcctg-3’	60	Bme 18I
IL4	C-33T rs2070874	5’- caagttactgacaatctggtgt-3’ 5’- cggcacatgctagcaggaa-3’	60	BstMA I
IL5	C-703T rs2069812	5’-cagggagagccaatcagt-3’ 5’-atgatgtccagactccaggatct-3’	60	PstN I
IL10	C-592A rs1800872	5’-atccaagacaacactactaa-3’ 5’-taaatatcctcaaagttcc-3’	54	Rsa I
IL10	G-1082A *rs*1800896	5’-aaggcaacactactaaggcttcctt-3’ 5’-taaatatcctcaaagttcc-3’	53	BstEN I
IL12B	1188A/C rs3212227	5’ -ttctatctgatttgcttta-3’ 5’-tgaaacattccatacatcc-3’	43	Taq I
TNFA	G-308A rs1800629	5’-aggcaataggttttgagggccat-3’ 5’-acactccccatcctcccggct-3’	58	Bsp19 I
TNFA	C-863A *rs*1800630	5’-ggctctgaggaatgggttac-3’ 5’-ctacatggccctgtcttcgttacg-3’	60	BstBA I
TGFB1	C-509T rs1800469	5’-ccgcttctgtcctttctagg-3’ 5’-aaagcgggtgatccagatg-3’	56	Bse21 I
IFNG	c.-1616C>T rs2069705	5’-attatcaagccagttttacag-3’ 5’-gattctttctcctcctttgta-3’	56	Hpa I

Примечание. * – производство (NEB, United Kindom).

Note. *, enzyme manufacturer: NEB, United Kingdom.

ТАБЛИЦА 2. ЧАСТОТЫ ГЕНОТИПОВ ПОЛИМОРФИЗМОВ ГЕНОВ ЦИТОКИНОВ У БОЛЬНЫХ АТОПИЧЕСКОЙ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ЗДОРОВЫХ ЕВРОПЕОИДОВ ВОСТОЧНОЙ СИБИРИ (%)

TABLE 2. FREQUENCIES OF DIFFERENT ALLELIC POLYMORPHISMS OF CYTOKINE GENES IN PATIENTS WITH ATOPIC BRONCHIAL ASTHMA AND HEALTHY EUROPEANS OF EAST SIBERIA (%)

Генотип Genotype	**Группы** Groups				**Группы сравнения = ОШ (95% ДИ)** Comparison groups = OR (95% CI)	**p**
	АБА (1) ABA (1) (n = 110)	**КАБА (2)** CABA (2) (n = 59)	**НАБА (3)** UABA (3) (n = 51)	**Контроль (4)** Control (4) (n = 138)		
IL2 (rs2069762)						
TT	55,5	54,2	56,9	40,7	$_{2,4}$ = 0,64 (0,40-1,03) $_{3,4}$ = 0,56 (0,34-0,40) $_{1,4}$ = 0,60 (0,41-0,89)	$p_{2,4}$ = 0,07 $p_{3,4}$ = 0,03 $p_{1,4}$ = 0,01
TG	37,3	37,3	37,2	45,2		
GG	7,2	8,5	5,9	14,1		
IL4 (rs2070874)						
CC	51,8	54,2	49,0	62,5	$_{2,4}$ = 1,15 (0,69-1,91) $_{3,4}$ = 1,47 (0,81-2,46) $_{1,4}$ = 1,29 (0,86-1,96)	$p_{2,4}$ = 0,59 $p_{3,4}$ = 0,14 $p_{1,4}$ = 0,22
CT	42,7	42,4	43,1	30,9		
TT	5,5	3,4	7,9	6,6		
IL4 (rs2243250)						
CC	54,6	59,3	49,0	62,2	$_{2,4}$ = 0,97 (0,58-1,63) $_{3,4}$ = 1,36 (0,81-2,28) $_{1,4}$ = 1,14 (0,75-1,73)	$p_{2,4}$ = 0,90 $p_{3,4}$ = 0,24 $p_{1,4}$ = 0,53
CT	40,9	37,3	45,1	30,4		
TT	4,5	3,4	5,9	7,4		
IL5 (rs2069812)						
C/C	40,0	39,0	41,2	45,7	$_{2,4}$ = 1,11 (0,70-1,76) $_{3,4}$ = 1,17 (0,72-1,90) $_{1,4}$ = 1,14 (0,78-1,66)	$p_{2,4}$ = 0,66 $p_{3,4}$ = 0,51 $p_{1,4}$ = 0,5
C/T	52,7	55,9	49,0	47,1		
T/T	7,3	5,1	9,8	7,2		

Таблица 2 (продолжение)
Table 2 (continued)

Генотип Genotype	**Группы** Groups				**Группы сравнения = ОШ (95% ДИ)** Comparison groups = OR (95% CI)	**p**
	АБА (1) ABA (1) (n = 110)	**КАБА (2)** CABA (2) (n = 59)	**НАБА (3)** UABA (3) (n = 51)	**Контроль (4)** Control (4) (n = 138)		
IL10 (rs1800872)						
CC	61,8	64,4	58,8	54,8	$_{2,4}$ = 0,85 (0,51-1,41) $_{3,4}$ = 0,83 (0,49-1,42) $_{1,4}$ = 0,84 (0,55-1,27)	$p_{2,4}$ = 0,52 $p_{3,4}$ = 0,50 $p_{1,4}$ = 0,41
CA	30,9	25,4	37,2	38,5		
AA	7,2	10,2	3,9	6,7		
IL10 (rs1800896)						
AA	34,6	39,0	29,4	28,3	$_{2,4}$ = 1,0 (0,65-1,55) $_{3,4}$ = 1,16 (0,74-1,83) $_{1,4}$ = 1,07 (0,75-1,53)	$p_{2,4}$ = 1,0 $p_{3,4}$ = 0,52 $p_{1,4}$ = 0,70
GA	42,7	37,3	49,0	58,7		
GG	22,7	23,7	21,6	13,0		
IL12B (rs3212227)						
A/A	68,2	71,2	64,7	59,4	$_{2,4}$ = 0,70 (0,40-1,23) $_{3,4}$ = 0,95 (0,55-1,65) $_{1,4}$ = 0,81 (0,52-1,26)	$p_{2,4}$ = 0,22 $p_{3,4}$ = 0,85 $p_{1,4}$ = 0,36
A/C	25,4	23,7	27,5	36,2		
C/C	6,4	5,1	7,8	4,4		
TNFA (rs1800629)						
GG	76,4	72,9	80,4	82,9	$_{2,4}$ = 1,47 (0,76-2,86) $_{3,4}$ = 1,02 (0,47-2,20) $_{1,4}$ = 1,26 (0,71-2,24)	$p_{2,4}$ = 0,25 $p_{3,4}$ = 0,96 $p_{1,4}$ = 0,43
GA	23,6	27,1	19,6	14,8		
AA	0,0	0,0	0,0	2,2		

Таблица 2 (окончание)
Table 2 (continued)

Генотип Genotype	**Группы** Groups				**Группы сравнения = ОШ (95% ДИ)** Comparison groups = OR (95% CI)	**p**
	АБА (1) ABA (1) (n = 110)	**КАБА (2)** CABA (2) (n = 59)	**НАБА (3)** UABA (3) (n = 51)	**Контроль (4)** Control (4) (n = 138)		
TNFA (rs1800630)						
CC	62,7	66,1	58,8	76,1	$_{2,4}$ = 1,69 (0,94-3,04) $_{3,4}$ = 2,27 (1,26-4,06) $_{1,4}$ = 1,95 (1,20-3,17)	$p_{2,4}$ = 0,08 $p_{3,4}$ = 0,005 $p_{1,4}$ = 0,007
CA	32,7	30,5	35,3	23,9		
AA	4,6	3,4	5,9	0,0		
TGFB1 (rs1800469)						
C/C	47,3	44,1	51,0	43,5	$_{2,4}$ = 0,88 (0,55-1,41) $_{3,4}$ = 0,95 (0,58-1,55) $_{1,4}$ = 0,91 (0,62-1,34)	$p_{2,4}$ = 0,59 $p_{3,4}$ = 0,83 $p_{1,4}$ = 0,64
C/T	46,4	54,2	37,2	50,0		
T/T	6,3	1,7	11,8	6,5		
IFNG (rs2069705)						
C/C	33,6	35,6	29,4	26,8	$_{2,4}$ = 0,72 (0,47-1,12) $_{3,4}$ = 1,01 (0,64-1,59) $_{1,4}$ = 0,84 (0,59-1,21)	$p_{2,4}$ = 0,14 $p_{3,4}$ = 0,97 $p_{1,4}$ = 0,35
*C/*T	46,4	49,2	45,1	50,7		
T/T	20,0	15,2	25,5	22,5		

Примечание. $p_{1,2}$ для всех SNP превышали значение 0,05.
Note. $p_{1,2}$ values for all SNPs exceeded 0.05.

Цель исследования: изучить вовлеченность функциональных полиморфизмов генов-кандидатов *IL2* (rs2069762), *IL4* (rs2070874 и rs2243250), *IL5* (rs2069812), *IL10* (rs1800872 и rs1800896), *IL12B* (rs3212227), *TNFA* (rs1800629 и rs1800630), *TGFB1* (rs1800469), *IFNG* (rs2069705) в патогенез АБА с различным уровнем контроля заболевания у европеоидов Восточной Сибири.

Материалы и методы

В работе использовали образцы ДНК жителей г. Красноярска, больных АБА (n = 110). Все обследованные или их родители дали письменное информированное согласие на участие в исследовании.

Были сформированы группы детей больных: среднетяжелой АБА с контролируемым течением заболевания (КАБА, n = 59; средний возраст

12,5±1,6 лет) и тяжелой/среднетяжелой АБА с неконтролируемым течением заболевания (НАБА, n = 51; средний возраст 13,1±2,8 лет). Диагноз, степень тяжести, уровень контроля над течением заболевания установлен в соответствии с рекомендациями рабочей группы GINA. Контрольная группа сформирована из практически здоровых детей без признаков атопии (n = 33, средний возраст 13,6±2,5 лет), а также популяционной выборки без АБА и аллергии в анамнезе (n = 105, средний возраст 38,3±5,4 лет). Предварительно перед объединением был проведен сравнительный анализ частоты аллелей в контрольных группах разного возраста, статистически значимых отличий не выявлено.

Общие критерии включения в исследование: диагноз атопическая бронхиальная астма, среднетяжелое/тяжелое течение, отсутствие ОРВИ и других острых заболеваний на момент обследования, европеоидное происхождение (3 поколения). Использован тест по контролю над астмой (ACT™). Результат теста в группе КАБА составил 22,5±2,6 балла, в группе НАБА – 14,8±3,1 балла (p < 0,001). Критерии включения в контрольную группу: практически здоровые индивиды, отрицательный аллергологический анамнез, уровень общего IgE < 100 МЕ/мл, европеоидное происхождение (3 поколения).

Для выделения ДНК из периферической крови использован стандартный набор («Лаборатория Медиген», Новосибирск). Изученные генные варианты локализованы в промоторных участках соответствующих генов, для гена *IL12B* – в 3'-UTR. Амплификация проводена путем полимеразной цепной реакции (ПЦР) (табл. 1) на амплификаторе «Терцик МС2» («ДНК-технология», Москва). Генотипирование аллельных вариантов осуществлено методом рестрикционного анализа продуктов амплификации (ПДРФ-анализ) специфических участков генома с использованием эндонуклеаз рестрикции («Сибэнзим», г. Новосибирск). Продукты рестрикции фракционировали в 2% агарозном геле, окрашенном бромистым этидием.

Частоты генотипов по полиморфным локусам проверяли на соответствие равновесию Харди–Вайнберга (РХВ) с помощью критерия χ^2 и точного теста Фишера. Сравнение частот аллелей и генотипов между группами проводили с помощью калькулятора http://gen-exp.ru/calculator_or.php. В качестве меры степени ассоциации генетических маркеров с фенотипами использовали величину отношения шансов (ОШ) с расчетом для него 95% доверительного интервала (ДИ). Анализ гаплотипов проводили с помощью пакета haplo.ccs для программной среды R.

Результаты

Сравнения частот аллелей и генотипов проведены как между общей группой АБА и контролем, так и между группами, выделенными с учетом степени контроля над заболеванием (КАБА и НАБА), и между каждой из групп с популяционной выборкой (табл. 2).

Получены статистически значимые отличия между группой НАБА и контрольной выборкой по частотам генотипов *IL2* (rs2069762): генотип GG чаще встречается в контрольной группе (14,1% по сравнению с 5,9% в группе НАБА, p = 0,03).

Сравнительный анализ частоты генотипов полиморфизма *TNFA* (rs1800630) показал статистически значимые отличия между группами АБА и контрольной выборкой (ОШ 1,95; p = 0,007), а также между группой НАБА и контрольной выборкой (OR, p = 0,005). Аллельный вариант С чаще встречается в контрольной группе (88,0%) по сравнению с общей группой АБА (79,1%) и НАБА (76,5%).

Для остальных исследованных полиморфизмов, отличий в частотах аллелей и генотипов между больными АБА и контрольной группой не установлено.

При сравнении гаплотипов *IL4* (rs2070874 и rs2243250) с поправкой на пол и возраст, с использованием аддитивной модели наследования, показано, что наиболее часто встречающийся гаплотип СС (частота в группах АБА/КАБА/НАБА составляет 0,75/0,76/0,74 соответственно) является протективным в отношении риска развития атопической бронхиальной астмы (RR 0,53; SE 0,32; p = 0,0439). Гаплотип СС может служить протективным генетическим маркером АБА с контролируемым (RR 0,26; SE 0,38; p = 0,0008) и неконтролируемым (RR 0,3; SE 0,38; p = 0,0018) течением заболевания.

В результате анализа гаплотипов полиморфизмов в гене *IL10* (rs1800872 и rs1800896) с использованием аддитивной модели наследования с поправкой на пол и возраст статистически значимых отличий между группами с разной степенью контроля АБА с популяционной выборкой не выявлено.

При сравнении гаплотипов *TNFA* (rs1800629 и rs1800630) с поправкой на пол и возраст, с использованием аддитивной модели наследования, показано, что гаплотип GC является протек-

тивным в отношении риска развития АБА (RR 0,59±0,17; p = 0,0028), а гаплотип GA – предрасполагающим к заболеванию (RR 2,07±0,25; p = 0,0034). Это характерно для атопической бронхиальной астмы вне зависимости от степени контроля заболевания (КАБА GA: RR 1,93±1,2; p = 0,0414; НАБА GA: RR 2,43±0,31; p = 0,0051).

Обсуждение

Атопическая бронхиальная астма представляет собой многофакторное воспалительное заболевание, связанное со сложными процессами цитокиновой регуляции межклеточных взаимодействий. На май 2017 года, согласно системе Phenopedia (https://phgkb.cdc.gov/HuGENavigator/startPagePhenoPedia.do), в отношении бронхиальной астмы исследовано более 1300 генов, в том числе цитокинов и их рецепторов. Цитокины занимают важное место в регуляции иммунного ответа при аллергическом воспалении, которое имеет ведущее значение при развитии бронхиальной астмы. Генетический полиморфизм цитокиновой сети влияет на уровень концентрации цитокинов в сыворотке крови, что в свою очередь оказывает эффект на формирование контролируемого или неконтролируемого течения АБА. Такие ассоциации между определенным аллельным вариантом генов и уровнем продукции описаны для ряда цитокинов [11, 12, 13]. Некоторые из исследований имеют противоречивые данные о роли генетических факторов в патогенезе астмы [3, 16]. В проведенном исследовании изучены однонуклеотидные замены в генах цитокинов, продуцируемых Th1-лимфоцитами (IL-2, IL-12, TNFα, TGF-β, IFNγ), Th2-лимфоцитами (IL-4, IL-5, IL-10) и Treg-клетками (IL-10, TGF-β).

По данным проведенного исследования, у европеоидов Восточной Сибири частоты аллелей и генотипов по изученным полиморфизмам соответствуют таковым в других европеоидных популяциях мира.

В результате проведенного исследования установлена ассоциация аллеля T полиморфизма rs2069762 гена *IL2* с АБА. Цитокин IL-2 играет важную роль в пролиферации активированных Т-лимфоцитов и угнетении ответа лимфоцитов путем индуцирования продукции Т-супрессоров [10]. Ранее показано, что аллель *IL2**T связан со сниженной продукцией цитокина в культуре лимфоцитов периферической крови здоровых лиц [8, 11]. Поскольку IL-2 является цитокином Th1-профиля, вариант, который уменьшает выработку IL-2 (аллель T), будет иметь тенденцию искажать баланс Th1/Th2 в сторону Th2, что типично для атопии. Таким образом, результаты, показывающие снижение экспрессии IL-2, связанной с аллелем T, хорошо коррелируют с полученными нами данными. Следовательно, генотип TT-330 или аллельный вариант T можно считать предрасполагающим к развитию АБА и прогностическим маркером неконтролируемого течения заболевания.

В результате проведенного исследования установлен протективный эффект гаплотипа CC по двум изученным полиморфизмам гена *IL4* (rs2243250, rs2070874) в отношении риска развития АБА (RR 0,53±SE 0,32; p = 0,0439). При этом гаплотип CC может служить протективным генетическим маркером АБА как с контролируемым (RR 0,26±SE 0,38; p = 0,0008), так и неконтролируемым (RR 0,3±SE 0,38; p = 0,0018) течением заболевания. Цитокин IL-4 – один из ключевых интерлейкинов, участвующих в патогенезе атопии: он способствует пролиферации плазматических клеток, увеличивает экспрессию низкоаффинного рецептора к IgE на В-клетках, селективно индуцирует синтез IgE. Ранее показана ассоциация редкого аллельного варианта T-590 *IL4* (rs2243250) с гиперпродукцией IL-4 [6, 18, 22, 25]. Полученные нами результаты соответствуют данным литературы, включая результаты метаанализов, об ассоциации полиморфизмов *IL4* с бронхиальной астмой, в том числе в отношении АБА у детей и в популяциях различного этнического состава [9, 15, 19, 23, 24].

В нашем исследовании сравнительный анализ частоты генотипов полиморфизма *TNFA* (rs1800630) показал статистически значимые отличия между общей группой АБА и контрольной выборкой, а также между группой НАБА и контрольной выборкой. При сравнении гаплотипов *TNFA* (rs1800629 и rs1800630) показано, что гаплотип GC можно считать протективным по отношению риска развития АБА, а гаплотип GA – предрасполагающим к заболеванию. Это характерно для атопической бронхиальной астмы вне зависимости от степени контроля заболевания. TNF-α представляет собой провоспалительный цитокин, участвующий во многих аспектах развития патологии дыхательных путей при атопической бронхиальной астме, играет роль в возникновении аллергического воспаления и генерации гиперреактивности бронхов [2, 4, 14]. Однонуклеотидная замена -308G/A (rs1800629) в промоторном регионе ассоциирована с уровнем экспрессии гена и продукции TNFα – ал-

лельный вариант A-308 связан с высокой концентрацией [17, 21]. У носителей варианта A-308 существует повышенный риск развития бронхиальной астмы по сравнению с гомозиготными по аллелю GG [7, 24]. Эти данные подтверждают важную роль TNFα в патогенезе бронхиальной астмы, а ген *TNFA* может быть геном предрасположенности к заболеванию. Изучение гена *TNFA* в отношении развития бронхиальной астмы уступает только гену *IL4* (система Phenopedia) – множество исследований проведено на разных популяционных выборках.

Таким образом, в проведенном нами исследовании впервые получены данные о популяционных частотах аллелей и генотипов генов цитокинов у европеоидного населения Восточной Сибири. Установлена ассоциация полиморфизмов генов *IL2*, *IL4* и *TNF* с контролируемым и неконтролируемым течением АБА. Эти данные для европеоидной популяции Восточной Сибири получены впервые и представляют интерес с точки зрения пополнения данных о вкладе полиморфизма генов цитокинов в развитие атопической бронхиальной астмы и контроля течения заболевания у детей.

Список литературы / References

1. Barnes K.C., Freidhoff L.R., Nickel R., Chiu Y.F., Juo S.H., Hizawa N., Naidu R.P., Ehrlich E., Duffy D.L., Schou C., Levett P.N., Marsh D.G., Beaty T.H. Dense mapping of chromosome 12q13.12-q23.3 and linkage to asthma and atopy. *J. Allergy Clin. Immunol., 1999, Vol. 104, pp. 485-491.*

2. Carroll M.C., Katzman P., Alicot E.M., Koller B.H., Geraghty D.E., Orr H.T., Strominger J.L., Spies T. Linkage map of the human major histocompatibility complex including the tumor necrosis factor genes. *Natl. Acad. Sci. USA, 1987, Vol. 84, no. 23, pp. 8535-8539.*

3. Chen T., Liang W., Gao L., Wang Y., Liu Y., Zhang L., Zhang L. Association of single nucleotide polymorphisms in interleukin 12 (IL-12A and -B) with asthma in a Chinese population. *Hum. Immunol., 2011, Vol. 72, no. 7, pp. 603-606.*

4. Chen X., Xiong L., Qin S., Ma W., Zhou Q. Effect of tumor necrosis factor-alpha antagonism in asthma: a meta-analysis of the published literature. *J. Huazhong Univ. Sci. Technoloq. Med. Sci., 2011, Vol. 31, no. 1, pp. 137-141.*

5. Eijkemans M., Mommers M., de Vries S.I., van Buuren S., Stafleu A., Bakker I., Thijs C. Asthmatic symptoms, physical activity, and overweight in young children: a cohort study. *Pediatrics, 2008, Vol. 121, no. 3, pp. e666-672.*

6. Freidin M.B., Kobyakova O.S., Ogorodova L.M., Puzyrev V.P. Association of polymorphisms in the human IL4 and IL5 genes with atopic bronchial asthma and severity of the disease. *Comp. Func. Genomics, 2003, Vol. 4, no. 3, pp. 346-350.*

7. Gao J., Shan G., Sun B., Thompson P.J., Gao X. Association between polymorphism of tumour necrosis factor α-308 gene promoter and asthma: a meta-analysis. *Thorax, 2006, Vol. 61, pp. 466-471.*

8. Hoffmann S.C., Stanley E.M., Darrin Cox E., Craighead N., DiMercurio B.S., Koziol D.E., Harlan D.M., Kirk A.D., Blair P.J. Association of cytokine polymorphic inheritance and *in vitro* cytokine production in anti-CD3/CD28-stimulated peripheral blood lymphocytes. *Transplantation, 2001, Vol. 72, pp. 1444-1450.*

9. Liu Y., Zhuo A., Liu W., Xu S., Li S. The -33C/T polymorphism in the interleukin 4 gene is associated with asthma risk: a meta-analysis. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 2014, Vol. 24, no. 2, pp. 114-121.*

10. Malek T.R. The main function of IL-2 is to promote the development of T regulatory cells. *J. Leukoc. Biol., 2003, Vol. 74, no. 6, pp. 961-965.*

11. Matesanz F., Fedetz M., Leyva L., Delgado C., Fernández O., Alcina A. Effects of the multiple sclerosis associated -330 promoter polymorphism in IL2 allelic expression. *J. Neuroimmunol., 2004, Vol. 148, no. 1-2, pp. 212-217.*

12. Mörmann M., Rieth H., Hua T.D., Assohou C., Roupelieva M., Hu S.L., Kremsner P.G., Luty A.J., Kube D. Mosaics of gene variations in the Interleukin-10 gene promoter affect interleukin-10 production depending on the stimulation used. *Genes Immun., 2004, Vol. 5, no. 4, pp. 246-255.*

13. Movahedi M., Mahdaviani S.A., Rezaei N., Moradi B., Dorkhosh S., Amirzargar A.A. IL-10, TGF-beta, IL-2, IL-12, and IFN-gamma cytokine gene polymorphisms in asthma. *J. Asthma, 2008, Vol. 45, no. 9, pp. 790-794.*

14. Nicolae D., Cox N.J., Lester L.A., Schneider D., Tan Z., Billstrand C., Kuldanek S., Donfack J., Kogut P., Patel N.M., Goodenbour J., Howard T., Wolf R., Koppelman G.H., White S.R., Parry R., Postma D.S., Meyers D., Bleecker E.R., Hunt J.S., Solway J., Ober C. Fine mapping and positional candidate studies identify HLA-G as an asthma susceptibility gene on chromosome 6p21. *Am. J. Hum. Genet., 2005, Vol. 76, no. 2, pp. 349-357.*

15. Nie W., Zhu Z., Pan X., Xiu Q. The interleukin-4 -589C/T polymorphism and the risk of asthma: a meta-analysis including 7,345 cases and 7,819 controls. *Gene, 2013, Vol. 10, no. 520 (1), pp. 22-29.*

16. Padrón-Morales J., Sanz C., Dávila I., Muñoz-Bellido F., Lorente F., Isidoro-García M. Polymorphisms of the IL12B, IL1B, and TNFA genes and susceptibility to asthma. *J. Investig. Allergol. Clin. Immunol., 2013, Vol. 23, no. 7, pp. 487-494.*

17. Sharma S., Sharma A., Kumar S., Sharma S.K., Ghosh B. Association of TNF haplotypes with asthma, serum IgE levels, and correlation with serum TNF-(alpha) levels. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 2006, Vol. 35, pp. 488-495.*

18. 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.*

19. Tang L., Lin H.G., Chen B.F. Association of IL-4 promoter polymorphisms with asthma: a meta-analysis. *Genet. Mol. Res., 2014, Vol. 28, no. 13 (1), pp. 1383-1394.*

20. Tang S.P., Liu Y.L., Wang S.B., Weng S.F., Chen S., Zhang M.J., Dong L., Guo Y.H., Lin D.R., Hua Y.H., Wang D.Y. Trends in prevalence and risk factors of childhood asthma in Fuzhou, a city in Southeastern China. *J. Asthma, 2015, Vol. 52, no. 1, pp. 10-15.*

21. Virchow J.C. Jr., Walker C., Hafner D., Kortsik C., Werner P., Matthys H., Kroegel C. T cells and cytokines in bronchoalveolar lavage fluid after segmental allergen provocation in atopic asthma. *Am. J. Respir. Crit. Care Med., 1995, Vol. 151, pp. 960-968.*

22. Wang R.S., Jin H.X., Shang S.Q., Liu X.Y., Chen S.J., Jin Z.B. Associations of IL-2 and IL-4 Expression and Polymorphisms With the Risks of Mycoplasma pneumoniae Infection and Asthma in Children. *Arch. Bronconeumol., 2015, Vol. 51, no. 11, pp. 571-578.*

23. Yang H.J. Association between the interleukin-4 gene C-589T and C+33T polymorphisms and asthma risk: a meta-analysis. *Arch. Med. Res., 2013, Vol. 44, no. 2, pp. 127-135.*

24. Zhang J., Tian C., Xiao Y., He C., Bogati A., Huang J., Fan H. The -308 G/A polymorphism in TNF-α gene is associated with asthma risk: an update by meta-analysis. *J. Clin. Immunol., 2011, Vol. 31, pp. 174-185.*

25. Zhang S., Li Y., Liu Y. Interleukin-4 -589C/T Polymorphism is Associated with Increased Pediatric Asthma Risk: A Meta-Analysis. *Inflammation, 2015, Vol. 38, no. 3, pp. 1207-1212.*

Авторы:

Смольникова М.В. *— к.б.н., ведущий научный сотрудник, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия*

Фрейдин М.Б. *— д.б.н., старший научный сотрудник, Научно-исследовательский институт медицинской генетики, Томский национальный исследовательский медицинский центр Российской академии наук, г. Томск, Россия; Отдел близнецовых исследований и генетической эпидемиологии, Королевский колледж Лондона, Лондон, Великобритания*

Смирнова С.В. *— д.м.н., профессор, руководитель научного направления, Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр СО РАН», Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия*

Authors:

Smolnikova M.V.*, PhD (Biology), Leading Research Associate, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Freidin M.B.*, PhD, MD (Biology), Senior Research Associate, Research Institute of Medical Genetics, Tomsk National Research Medical Center, Russian Academy of Sciences, Tomsk, Russian Federation; Department of Twin Research and Genetic Epidemiology, King's College London, London, United Kingdom*

Smirnova S.V.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Scientific Direction, Federal Research Center «Krasnoyarsk Science Center» of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Scientific Research Institute of Medical Problems of the North, 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

МЕТОДИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ЭКСПЕРТНОЙ ОЦЕНКЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ И КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ПРЕПАРАТОВ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ ЧЕЛОВЕКА

Иванов В.Б., Мосягин В.Д., Кудашева Э.Ю., Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Борисевич И.В., Бондарев В.П.

ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия

Резюме. Проанализирован опыт Российской Федерации и ведущих зарубежных регуляторных органов в сфере обращения лекарственных средств по вопросам организации и проведения доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов иммуноглобулинов человека. В рамках предложенной классификации препаратов иммуноглобулинов человека приведены актуальные сведения об их регистрации в Российской Федерации. Сформулированы методические подходы и основные научные принципы и критерии экспертной оценки доклинических и клинических исследований препаратов крови. Уточнены требования экспертного учреждения, предъявляемые в ходе экспертной оценки материалов доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов нормальных, специальных и специфических иммуноглобулинов человека при их регистрации и внесении изменений в регистрационное досье. Предложены программы доклинических и клинических исследований лекарственных препаратов нормальных, специальных и специфических иммуноглобулинов человека, отвечающие требованиям российского законодательства, нормативным правовым актам в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза, учитывающие рекомендации руководств Европейского агентства по лекарственным средствам.

Ключевые слова: препараты иммуноглобулинов человека, доклинические исследования, клинические исследования, экспертиза, методические подходы, критерии оценки, регистрация, требования экспертного учреждения

Адрес для переписки:
Иванов Вячеслав Борисович
ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ
127051, Россия, Москва, Петровский бульвар, 8, стр. 2.
Тел.: 8 (499) 241-89-24.
E-mail: ivanov@expmed.ru

Address for correspondence:
Ivanov Vyacheslav B.
Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products
127051, Russian Federation, Moscow, Petrovsky blvrd, 8, bldg. 2.
Phone: 7 (499) 241-89-24.
E-mail: ivanov@expmed.ru

Образец цитирования:
В.Б. Иванов, В.Д. Мосягин, Э.Ю. Кудашева, Ю.В. Олефир, В.А. Меркулов, И.В. Борисевич, В.П. Бондарев «Методические подходы к экспертной оценке доклинических и клинических исследований препаратов иммуноглобулинов человека» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 615-628.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-615-628

© Иванов В.Б. и соавт., 2017

For citation:
V.B. Ivanov, V.D. Mosyagin, E.Yu. Kudasheva, Yu.V. Olefir, V.A. Merkulov, I.V. Borisevitch, V.P. Bondarev "Methodological approaches to expert evaluation of preclinical and clinical trials of human immunoglobulin products", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 615-628.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-615-628

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-615-628

METHODOLOGICAL APPROACHES TO EXPERT EVALUATION OF PRECLINICAL AND CLINICAL TRIALS OF HUMAN IMMUNOGLOBULIN PRODUCTS

Ivanov V.B., Mosyagin V.D., Kudasheva E.Yu., Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Borisevitch I.V., Bondarev V.P.

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation

Abstract. The article considers the experience of Russian and leading foreign regulatory agencies in organisation and conduction of preclinical and clinical trials of human immunoglobulin products. The authors suggest a classification of human immunoglobulins and provide updated information on authorization of these products in Russia. The article summarizes methodological approaches, basic scientific principles and criteria relating to expert evaluation of preclinical and clinical trials of blood products. The authors further define the expert body's requirements for data on preclinical and clinical trials of human normal immuniglobulins and human specific immunoglobulins for the prevention and/or treatment of infectious and non-infectious diseases which are submitted as part of applications for marketing authorization or marketing authorization variation. The article suggests programs of preclinical and clinical trials for human normal immunoglobulins and human specific immunoglobulins for the prevention and/or treatment of infectious and non-infectious diseases that are aligned with the Russian legislation and Eurasian Economic Union's regulations on medicines circulation, and have been elaborated with respect to the guidelines of the European Medicines Agency.

Keywords: human immunoglobulin products, preclinical trials, clinical trials, expert evaluation, methodological approaches, evaluation criteria, authorization, expert body's requirements

Введение

Потребность в лекарственных препаратах (ЛП) иммуноглобулинов человека (ИГЧ) в нашей стране и за рубежом постоянно возрастает. ЛП ИГЧ входят в перечень жизненно необходимых и важнейших ЛП, применяются в различных областях практической медицины при первичных и вторичных иммунодефицитах, аутоиммунных и инфекционных заболеваниях.

Подходы к экспертной оценке качества, эффективности и безопасности ЛП, в том числе препаратов крови, периодически уточняются, что связано с внесением изменений в Федеральный закон от 12.04.2010 № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» [11] и выходом новых подзаконных нормативно-правовых документов [10, 12, 14]. Меняются и международные требования к организации и проведению доклинических (ДИ) и клинических исследований (КИ) ЛП крови в связи с выходом новых руководств Европейского агентства по лекарственным средствам (ЕМА). Различия требований регуляторов к объему ДИ и КИ препаратов крови создают определенные сложности при экспертной оценке результатов исследований:

– для биологических ЛП, в том числе препаратов крови, в Российской Федерации с 01.01.2016 требуется предоставление результатов собственных ДИ в расширенном объеме и результатов собственных КИ, тогда как за рубежом объем доклинических токсикологических исследований сведен к минимуму при соответствии препаратов крови по качеству требованиям Европейской фармакопеи (ЕФ);

– различаются подходы к этапности проведения КИ отдельных групп препаратов крови. Например, для препаратов иммуноглобулинов человека нормальных (ИГЧН) за рубежом допускается начинать КИ с III фазы, в том числе у детей, что не допускается в Российской Федерации;

– имеются разночтения и с документами, регулирующими обращение ЛП в рамках Евразийского экономического союза (ЕАЭС), предписывающими в качестве приоритетных использовать международные документы, регламентирующие требования к качеству, ДИ и КИ ЛП, в частности руководства ЕМА.

Не урегулирован вопрос о взаимозаменяемости ЛП ИГЧ, так как ДИ и КИ таких препаратов, прежде всего отечественных производителей, ранее не проводились или проводились в сокращенном объеме. Имеется необходимость в унификации инструкций по медицинскому применению (ИМП) ЛП ИГЧ.

Указанные обстоятельства требуют уточнения методических подходов к экспертной оценке программ доклинических и клинических исследований ЛП ИГЧ человека в Российской Федерации.

Цель данной статьи состоит в уточнении требований экспертного учреждения, которые предъявляются при экспертной оценке качества, ДИ и КИ препаратов ИГЧ при их регистрации и внесении изменений в регистрационное досье.

Классификация препаратов иммуноглобулинов человека и сведения о регистрации

С целью совершенствования системы экспертной оценки качества, эффективности и безопасности ЛП ИГЧ используется следующая их классификация.

Препараты иммуноглобулинов человека – группа иммунобиологических ЛП, представляющих собой иммунологически активную белковую фракцию сыворотки или плазмы крови человека, преимущественно иммуноглобулинов класса G (IgG), несущую антительную активность различной специфичности [5].

Препараты ИГЧ подразделяют на иммуноглобулины нормальные, иммуноглобулины специфические, иммуноглобулины специального назначения:

– иммуноглобулины нормальные (для внутримышечного, подкожного, внутривенного введения, энтерального применения) применяют для заместительной терапии при первичных иммунодефицитах с нарушением продукции антител, заместительной терапии при вторичных иммунодефицитах, в качестве иммуномодулирующего средства и для специфической профилактики определенных бактериальных и вирусных инфекций;

– иммуноглобулины специфические (для внутримышечного, внутривенного введения) предназначены для профилактики и/или лечения конкретного инфекционного заболевания;

– иммуноглобулины специального назначения (для внутримышечного, внутривенного введения) применяют для лечения и/или профилактики неинфекционных заболеваний, например, аллергических заболеваний, резус-конфликта и др.

В Российской Федерации в настоящее время зарегистрирован 61 ЛП ИГЧ: иммуноглобулинов человека нормальных – 30 (для внутривенного введения – 18, из них 1 и для подкожных инфузий; для внутримышечного введения – 9; для энтерального введения – 3); иммуноглобулинов человека специфических – 23 (против клещевого энцефалита – 5, противостолбнячные – 2, противостафилококковые – 7, антирабические – 3; противооспенный – 1, антицитомегаловирусные – 2, против гепатита В – 3); иммуноглобулинов человека специального назначения – 8 (антирезусные – 7; противоаллергический – 1) [1].

Ежегодно регистрируются новые ЛП ИГЧ. Проводятся КИ с целью регистрации новых ИГЧН для подкожного введения [35]. Разрабатывается свечевая форма препарата ИГЧ для лечения хронических форм герпетической болезни [6].

Элементы методологии оценки качества, эффективности и безопасности препаратов иммуноглобулинов человека

В целях определения подходов к экспертной оценке ДИ и КИ ЛП ИГЧ нами проведен анализ документов Российской Федерации, Европейского союза (ЕС), США, других государств и международных организаций, определяющих требования к организации и проведению ДИ и КИ препаратов крови, при этом использованы действующие нормативные правовые акты и проекты таких актов, размещенные на интернет-сайтах соответствующих регуляторных органов.

При разработке подходов к экспертной оценке программ доклинического и клинического изучения новых ЛП ИГЧ следует учитывать следующие обстоятельства:

– методически недостаточно обеспечены такие элементы методологии экспертизы препаратов крови, как порядок организации и проведения ДИ и КИ непосредственно для каждой отдельной группы препаратов крови, стандартизация деятельности по рациональному медицинскому применению ЛП крови, система пострегистрационного мониторинга. Указанные причины делают целесообразным в данной ситуации изучение возможности использования опыта зарубежных регуляторов в этой области. При этом анализ регламентирующих документов, безусловно, должен сопоставляться с отечественной законодательной базой. Наиболее четко очерченными и понятными как для разработчиков, так и экспертов, являются требования европейского регулятора (EMA);

– в соответствии с требованиями Федерального закона № 429-ФЗ с 01.01.2016 при регистра-

ции биологических препаратов, разрешенных для медицинского применения в Российской Федерации более 20 лет, необходимо представлять отчеты о результатах собственных доклинических (фармакодинамических, фармакокинетических, токсикологических) и собственных клинических (фармакокинетических, фармакодинамических, эффективности и безопасности, опыте пострегистрационного применения [при наличии]) исследований [9]. ДИ должны проводиться в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики [13]. Состав и показатели качества препарата при проведении КИ должны соответствовать таковым при проведении ДИ и конечному продукту, представляемому на регистрацию;

– ЛП ИГЧ в течение многих десятков лет производят по одинаковой технологии спиртового фракционирования, имеются обширные данные по их действию и возможным побочным эффектам. Поэтому полных токсикологических исследований (общетоксического и специфических видов токсичности) заявителями препаратов крови ранее не проводилось. Вопросы эффективности и безопасности в основном оценивались в процессе их КИ, а для ряда ЛП ИГЧ в Российской Федерации КИ ранее не проводились;

– для препаратов ИГЧ не удается в полном объеме достичь основной цели проведения токсикологических исследований, которая заключается в оценке безопасности и установления характера выраженности повреждающего действия лекарственных средств (ЛС) на организм экспериментальных животных, не удается определить токсическую или летальную дозу или зависимость «доза–эффект». Поэтому токсикологические исследования дают мало информации. Многократное введение препаратов крови человека вызывает иммунные реакции в организме животных на чужеродный человеческий белок, нарушает физиологические процессы и искажает картину действия ЛС на состояние животного [19]. Вместе с тем возможное наличие в препаратах крови человека фрагментов антител, технологических остатков, различных биологических факторов делает необходимым проведение доклинического исследования острой, субхронической токсичности, местнораздражающего действия и пирогенности;

– при проведении ДИ следует учитывать, что изучение фармакокинетики и фармакодинамики препаратов крови человека в гетерологичной системе имеет очень ограниченную информативность, так как не существует животных моделей, достаточно адекватно воспроизводящих фармакокинетику ЛП в крови человека;

– изучение метаболизма для препаратов белковой природы не требуется, так как в организме они распадаются до аминокислот и не образуют активных метаболитов. Оно необходимо только для вспомогательных компонентов, не изученных соответствующим образом в ДИ.

В настоящее время Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и ЕМА требуют предоставление данных по токсикологии при изменении вспомогательных веществ в лекарственной форме, введении стадий химической инактивации вирусов, введении новых стабилизаторов в растворитель для лиофилизированных форм, а также в случае изменения технологии и состава лекарственной формы. Для вновь разработанных препаратов крови токсикологические исследования проводятся практически в полном объеме, исключая длительное повторное введение препарата [19].

При определении объема представления результатов собственных ДИ препаратов ИГЧ заявителям рекомендуется использовать подходы руководств по проведению экспертизы ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава России [19, 20, 21, 22], документов ЕАЭС [8], руководств ЕМА.

Методология экспертизы препаратов ИГЧ должна представлять собой комплекс процедур, выполняемых в регламентированном порядке. Несомненно, фундаментом обеспечения качества, эффективности и безопасности препаратов ИГЧ является надлежащая организация процесса производства. Методы, выбранные для промышленного выделения активного компонента биологической фармацевтической субстанции, должны не только обеспечить получение ЛП крови требуемого профиля качества, но и гарантировать сохранение структуры, функции и биологической (специфической) активности его действующего вещества, обеспечивать специфическую и вирусную безопасность получаемых препаратов. Выбор вспомогательных веществ, стабилизаторов, вирусинактивирующих агентов должен быть обоснован, отсутствие консервантов и антибиотиков подтверждено.

Профиль ЛП ИГЧ должен быть не только безопасным, но и тщательно изученным и подтвержденным по химическим, физико-химическим, иммунохимическим показателям (прозрачности, цветности, pH, содержанию белка, фракционному составу, количественному определению классов иммуноглобулинов G, A, M, электрофо-

ретическому составу (однородности), механическим включениям (видимым и невидимым), извлекаемому объему, термостабильности, времени растворения, осмоляльности и др.). Желаемый терапевтический эффект должен быть спрогнозирован по результатам оценки специфической активности активного компонента. Методы, выбранные для подтверждения требуемого профиля качества, эффективности и безопасности должны быть научно обоснованы, объективны и адекватны, информативны и стандартизованы.

Выбранная форма выпуска ЛП ИГЧ, первичной и вторичной его упаковки должна обеспечивать сохранение требуемого профиля качества, эффективности в течение регламентированного срока годности и быть разрешена для упаковки ЛС при соответствующих способах их введения. Сохранность совокупности характеристик ЛП ИГЧ должна быть обоснована изучением их стабильности в течение предполагаемого срока годности.

Организация деятельности по проведению ДИ и КИ препаратов крови – следующий принципиальный элемент методологии экспертной оценки их качества, эффективности и безопасности.

При экспертной оценке результатов доклинических и клинических исследований ЛП ИГЧ используются следующие основные научные принципы:

– научной обоснованности, объективности, всесторонности и полноты исследований;

– комплексности экспертной оценки;

– законности заключения об эффективности и безопасности ЛП;

– полного изучения эффективности и безопасности ЛП на этапах ДИ и КИ;

– соответствия проведения ДИ и КИ правилам надлежащей лабораторной практики и надлежащей клинической практики [12, 13];

– учета при планировании и экспертной оценке протоколов и результатов ДИ и КИ рекомендаций международных организаций, EMA, FDA в части, не противоречащей законодательству Российской Федерации.

Критерии экспертной оценки результатов ДИ препаратов крови включают оценку научной обоснованности заявителем программы ДИ, оценку выбора экспериментальной модели исследования, оценку изучения фармакологических и фармакокинетических свойств ЛП, острой, субхронической (хронической) токсичности, мутагенности, канцерогенности, репродуктивной токсичности, раздражающего действия и других токсикологических исследований (аллергенность, антигенность, иммунотоксичность, иммуногенность и др.), перечень и объем которых зависит и может изменяться в зависимости от вида препарата крови.

Критерии экспертной оценки КИ включают оценку результатов фармакокинетических и фармакодинамических исследований, полноты объема выполненных КИ с целью установления его фармакодинамических, иммунологических эффектов, механизма действия, профилактической эффективности, побочных действий, особенностей взаимодействия с другими ЛП, оценку соотношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ЛП.

Стандартизация деятельности по рациональному медицинскому применению ЛП ИГЧ в форме типовых клинико-фармакологических статей (ТКФС) или типовых инструкций по применению, содержащих актуальную информацию о порядке их применения с учетом международного опыта, рекомендаций Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), руководств EMA и FDA – следующая важная составляющая методологии экспертной оценки качества, эффективности и безопасности таких препаратов. Заявители при составлении программы клинической разработки и ИМП ЛП должны руководствоваться содержанием ТКФС.

Общие требования к программе доклинических исследований препаратов иммуноглобулинов человека

Программа ДИ препаратов ИГЧ должна, как правило, включать изучение на адекватно выбранной экспериментальной модели при соответствующей лекарственной форме пути введения острой, субхронической токсичности, местно-раздражающего действия в патоморфологических исследованиях места введения препарата, пирогенности. В ходе токсикологических исследований проводят оценку влияния препарата на массу тела, потребление пищи и воды, ректальную температуру, дыхательную и сердечно-сосудистую системы, функциональное состояние ЦНС, параметры функционального состояния почек, свертываемость крови, гематологические показатели, биохимические показатели крови, миелограмму, массовые коэффициенты внутренних органов и их гистологию.

Прочие ДИ специфической токсичности (репродуктивная токсичность, генотоксичность, канцерогенность, мутагенность) не являются обязательными, если в процессе производства не используются новые сорбенты, растворители,

стабилизаторы, требующие изучения по указанным показателям.

Качество препаратов ИГЧ должно соответствовать требованиям ОФС.1.8.1.0003.15 «Иммуноглобулины человека» [5].

В качестве препарата сравнения при ДИ может быть использован соответствующий препарат ИГЧ, зарегистрированный в Российской Федерации.

Для отдельных групп препаратов ИГЧ могут предъявляться дополнительные требования к программе ДИ, которые будут рассмотрены ниже вместе с особенностями проведения КИ.

Особенности проведения доклинических и клинических исследований препаратов иммуноглобулинов человека нормальных

Для препаратов ИГЧН для внутримышечного введения указанная выше программа ДИ является достаточной. Их качество должно дополнительно соответствовать требованиям ФС.3.3.2.0007.15 «Иммуноглобулин человека нормальный» [4].

В ИМП отечественных препаратов ИГЧН указаны следующие показания к применению: профилактика гепатита А, профилактика кори, профилактика и лечение гриппа, профилактика коклюша, профилактика менингококковой инфекции, профилактика полиомиелита, лечение гипо- и агаммаглобулинемии у детей, повышение резистентности организма в периоде реконвалесценции острых инфекционных заболеваний с затяжным течением и при хронических пневмониях. При этом перечень показаний в ИМП различных препаратов значительно различается и требует пересмотра. Результаты многочисленных КИ подтвердили неэффективность применения иммуноглобулина для профилактики и лечения гриппа, а также внутримышечного введения препаратов для заместительной терапии и иммуномодуляции [23, 34].

В США для ИГЧН для внутримышечного введения в качестве показаний к применению указаны: профилактика гепатита А, кори, краснухи, ветряной оспы (при отсутствии возможности применения специфического иммуноглобулина) [32].

В руководствах ЕМА отсутствуют требования о необходимости проведения КИ для препаратов ИГЧН для внутримышечного введения только по показанию «для профилактики гепатита А». Качество ЛП должно соответствовать требованиям ЕФ, а производство – требованиям GMP. Минимальное содержание антител в препарате должно составлять 100 МЕ/мл. Для других показаний к применению требуется проведение собственных КИ. Биологические и фармакокинетические данные недостаточны для подтверждения клинической эффективности [25, 28].

При регистрации в Российской Федерации в программу КИ препаратов ИГЧН для внутримышечного введения целесообразно включить открытое КИ I фазы на здоровых добровольцах с целью оценки переносимости и безопасности и КИ II-III фазы по всем показаниям, кроме «для профилактики гепатита А, кори», для которых проведение КИ не требуется. Содержание специфических антител к возбудителям инфекций по вновь регистрируемым показаниям должно быть указано в нормативной документации в качестве показателя контроля качества, а нормы обоснованы.

В качестве препарата сравнения при планировании КИ рекомендуется использовать препарат ИГЧН для внутримышечного введения, зарегистрированный в Российской Федерации.

Для препаратов ИГЧН для внутривенного введения программа ДИ включает дополнительные исследования.

Качество препаратов должно соответствовать требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации [3, 4, 5].

Изучение аллергенности может быть проведено путем оценки анафилактогенной активности в реакции активной кожной анафилаксии, методом накожных аппликаций и конъюнктивальной пробы. Для оценки тромбогенного потенциала используется тест венозного стаза на кроличьей модели Весслера.

Оценка функционального состояния Fc-фрагмента проводится, например, с помощью реакции коагглютинации, которая основана на способности белка А стафилококка штамма Cowan I избирательно связываться с Fc-фрагментом IgG.

Руководства ЕМА [24, 29] требуют при регистрации препарата оценивать Fab- и Fc-функции (функциональная целостность) по способности фиксировать комплемент, опсонизации, фагоцитозу, антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности.

Подлинность препаратов ИГЧН для внутривенного введения должна быть подтверждена наличием только сывороточных белков крови человека; основная фракция IgG должна составлять не менее 95% от общего белка; содержание мономеров и димеров IgG должно быть не менее 90%, полимеров и агрегатов – не более 3%.

При определении специфической активности препаратов ИГЧН для внутривенного введения указывают количественное содержание противо-

бактериальных антител (минимум против одного возбудителя) и количественное содержание противовирусных антител (минимум против одного возбудителя).

Для оценки специфической безопасности обязательно определение следующих показателей качества: антикомплементарная активность; анти-А- и анти-В-гемагглютинины; анти-D-антитела.

При планировании проведения КИ по лечению аутоиммунных заболеваний в ДИ должна быть изучена иммуномодулирующая и противовоспалительная активность: способность ингибировать активность ауто-антител *in vitro*; на экспериментальных моделях аутоиммунных заболеваний *in vivo* [29].

При оценке программы КИ препаратов ИГЧН для внутривенного введения эксперты используют подходы, изложенные в руководствах EMA [24, 29], с учетом требований законодательства Российской Федерации.

Препараты ИГЧН для внутривенного введения являются основными при лечении пациентов с первичными иммунодефицитами (ПИД) с нарушенной продукцией антител, а также вторичными иммунодефицитами с тяжелыми и рецидивирующими бактериальными инфекциями при неэффективности антибактериальной терапии, неэффективности вакцинации пневмококковой вакциной или сывороточном уровне IgG менее 4 г/л. Эти показания к применению являются общепринятыми в мировой практике и должны быть отражены в ИМП данной группы препаратов, зарегистрированных в Российской Федерации [2, 16, 24].

Применение препаратов ИГЧН для внутривенного введения в качестве иммуномодулирующего средства при идиопатической тромбоцитопенической пурпуре (ИТП) у детей или у взрослых при высоком риске кровотечений или перед хирургическими вмешательствами с целью коррекции количества тромбоцитов, при синдроме Гийена–Барре, при болезни Кавасаки отражено в показаниях к применению не всех ЛП отечественных производителей, так как большинство из них ранее регистрировались без проведения собственных КИ. Кроме того, в настоящее время препараты ИГЧН для внутривенного введения используются как иммуномодуляторы для лечения хронической воспалительной демиелинизирующей полирадикулоневропатии и мультифокальной моторной невропатии [24].

Препараты ИГЧН для внутривенного введения в ряде случаев успешно применялись по незарегистрированным показаниям (off-label) для лечения и других вторичных иммунодефицитов у пожилых пациентов, у недоношенных новорожденных детей, при неонатальном сепсисе, энтеровирусном менингоэнцефалите, ротавирусном энтероколите, цитомегаловирусном пневмоните при трансплантации солидных органов, токсическом шоке, псевдомембранозном колите [33].

В Российской Федерации в программу КИ препаратов ИГЧН для внутривенного введения на предрегистрационном этапе целесообразно включить открытое клиническое исследование I фазы на здоровых добровольцах с целью оценки переносимости и безопасности.

Далее рекомендуется провести клинические исследования III фазы. При разработке протоколов клинических исследований III фазы рекомендуется использовать подходы, указанные в руководстве EMA [29], с учетом требований законодательства Российской Федерации.

1) Открытое клиническое исследование III фазы у взрослых пациентов с ПИД в течение 12 месяцев с оценкой эффективности, безопасности, фармакокинетических параметров.

Рекомендуемой первичной конечной точкой при оценке эффективности является частота серьезных бактериальных инфекций (менее 1,0 инфекции/субъект/год): бактериемия или сепсис, бактериальный менингит, остеомиелит/септический артрит, бактериальные пневмонии, висцеральные абсцессы.

Рекомендуемыми вторичными конечными точками являются: фармакокинетические параметры (концентрация иммуноглобулинов через 5-6 инфузий препарата перед последующей инфузией в течение 6 месяцев, AUC, $T_{1/2}$, C_{max}, T_{max}, V_d, K_{el}), частота всех других инфекций, количество и длительность применения антибиотиков, госпитализации, дней трудопотерь, повышения температуры тела.

2) Открытое клиническое исследование III фазы у детей с ПИД.

3) Открытое сравнительное (с историческим контролем по данным литературы) клиническое исследование III фазы у 30 взрослых пациентов с ИТП с длительностью заболевания более 12 месяцев и количеством тромбоцитов перед началом введения исследуемого препарата $\leq 30 \times 10^9$/л.

Рекомендуемой первичной конечной точкой эффективности является доля пациентов с уровнем тромбоцитов $\geq 50 \times 10^9$/л на 9-й день или ранее от первого введения препарата ИГЧН

для внутривенного введения по рекомендуемой схеме лечения ИТП.

Положительные результаты клинических исследований являются основанием для применения препаратов ИГЧН для внутривенного введения по указанным выше показаниям к применению.

Для других показаний (дерматомиозит, хроническая крапивница, миастения гравис и др.) требуются отдельные подтверждающие собственные клинические исследования [29].

Для препаратов ИГЧН для подкожного введения программа ДИ аналогична программе исследования ИГЧН для внутривенного введения, за исключением отсутствия необходимости изучения антикомплементарной активности.

Подкожный путь введения ЛП ИГЧН используется при лечении первичного гуморального иммунодефицита у взрослых и детей на основании проведенных КИ. Подкожные инфузии обычно выполняются еженедельно, тогда как внутривенные – каждые 3-4 недели. Переход к подкожным инфузиям осуществляется после предшествующих внутривенных инфузий, исходя из которых рассчитывается стартовая доза. Препараты ИГЧН для подкожного введения имеют ряд преимуществ по сравнению с препаратами ИГЧН для внутривенного введения: возможность самостоятельного введения на дому, при затрудненном венозном доступе, при развитии системных нежелательных явлений (головная боль, повышение температуры, озноб, миалгии), бóльшая независимость, лучший контроль и улучшение качества жизни за счет терапии на дому, методика подкожного введения легко осваивается пациентами.

При регистрации новых отечественных препаратов ИГЧН для подкожного введения рекомендуется проведение КИ I фазы на здоровых добровольцах в целях установления безопасности и переносимости. В программу предрегистрационного клинического изучения препарата рекомендуется также включить открытое клиническое исследование III фазы у взрослых пациентов с ПИД в течение 12 месяцев с оценкой эффективности, безопасности, фармакокинетических параметров и открытое клиническое исследование III фазы у детей с ПИД. При разработке дизайна исследования, выборе первичных и вторичных конечных точек эффективности рекомендуется использовать подходы, изложенные в руководстве ЕМА [28].

При успешном завершении КИ препарат ИГЧН для подкожного введения может применяться по следующим показаниям [25]: ПИД с нарушенной продукцией антител; гипогаммаглобулинемия и рецидивирующие бактериальные инфекции у пациентов с хроническим лимфоидным лейкозом при неэффективности профилактической антибактериальной терапии или наличии противопоказаний; гипогаммаглобулинемия и рецидивирующие бактериальные инфекции у пациентов с множественной миеломой; гипогаммаглобулинемия у пациентов перед и после аллогенной трансплантации гемопоэтических стволовых клеток.

Препараты ИГЧН для энтерального применения зарегистрированы только в Российской Федерации, для них отсутствуют отдельные отечественные и международные документы, регламентирующие программы ДИ и КИ, поэтому их разработка полностью входит в компетенцию заявителя с соблюдением общих требований к разработке ЛП.

Особенности проведения доклинических и клинических исследований препаратов иммуноглобулинов человека специального назначения

К программе клинической разработки препаратов противоаллергических иммуноглобулинов эксперты предъявляют такие же требования, как к ЛП ИГЧН в зависимости от пути введения. Эффективность и безопасность препарата должна быть изучена на профильных пациентах в сравнении с зарегистрированным в Российской Федерации аналогичным препаратом.

Препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D. В Российской Федерации зарегистрированы 6 препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) для внутримышечного введения и 1 препарат для внутримышечного и внутривенного введения [1].

Активным компонентом препаратов является IgG, содержащий неполные анти-Rh_o(D)-антитела, также могут присутствовать небольшие количества антител к другим антигенам групп крови. Иммуноглобулин человека антирезус Rh_o(D) получают из плазмы крови резус-отрицательных доноров, намеренно иммунизированных резус-положительными эритроцитами группы 0, либо подвергшихся естественному воздействию резус-положительных эритроцитов.

Качество препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) должно отвечать требованиям Государственной фармакопеи Российской Федерации, предъявляемым к иммуноглобулинам человека [3, 5].

При оценке программ доклинических и клинических исследований эксперты используют требования руководств EMA [27, 30, 31].

Программа доклинических исследований включает общие требования к препаратам ИГЧ и ряд дополнительных.

Препараты иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) для внутривенного введения дополнительно подлежат испытаниям по показателям «Антикомплементарная активность» и «Анти-А- и анти-В-гемагглютинины».

Должны быть представлены следующие данные, относящиеся к фармакодинамике, терапевтической активности и профилю безопасности:

– *in vivo* анализ эффективности адресного разрушения резус-положительных эритроцитов с целью оценки сопоставимости препарата;

– содержание антител против различных Rh(D) эритроцитов (R1R1, R1R2, R2R2);

– *in vivo* и/или *in vitro* количественное определение анти-D-антител;

– определение подклассов IgG, в частности IgG1 и IgG3.

Содержание специфических антител должно быть указано в нормативной документации в качестве показателя контроля качества, а нормы обоснованы.

При регистрации в Российской Федерации в программу клинических исследований ЛП иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) целесообразно включить открытое клиническое исследование I фазы на здоровых добровольцах с целью оценки фармакокинетики, переносимости и безопасности и клинические исследования II-III фазы по вводимым показаниям в ИМП.

Рекомендованными EMA [30, 31] показаниями к применению препаратов иммуноглобулина человека антирезус Rh_o(D) вне зависимости от пути введения являются:

1) Профилактика резус-положительной иммунизации резус-отрицательных женщин, не сенсибилизированных к антигену Rho(D):

– дородовая профилактика;

– дородовая профилактика осложнений беременности: аборт или угрожающий аборт, внематочная беременность или пузырный занос, внутриутробная смерть плода, трансплацентарная трансфузия в результате дородового кровотечения, амниоцентеза, биопсии хориона, акушерских манипуляций, например, наружного акушерского поворота, инвазивного вмешательства, кордоцентеза, травмы брюшной полости или терапевтического внутриутробного вмешательства;

– послеродовая профилактика.

2) Лечение резус-отрицательных пациентов после переливания несовместимой резус-положительной крови или других препаратов, содержащих эритроциты.

Открытое клиническое исследование I фазы: фармакокинетические исследования разовой дозы следует проводить на 15 резус-отрицательных пациентах, после внутривенного и/или внутримышечного введения (в зависимости от предполагаемого способа введения). Должны быть изучены Cl, V_d, AUC, $T_{1/2}$ (α и β).

Клинические исследования II-III фазы проводятся, по крайней мере, на 200 не иммунизированных резус-отрицательных беременных женщинах с резус-положительным плодом. Должен быть изучен как дородовой, так и послеродовой период, в зависимости от обстоятельств и показаний к применению. Следует использовать принятый режим дозирования препарата путем предполагаемого способа введения. Забор крови осуществляют непосредственно перед введением препарата, через 72 ч и 3-6 мес. после терапии анти-D-иммуноглобулином. Следует контролировать количество анти-D-антител через 3 и 6 мес. после начала терапии [27].

Эффективность предотвращения резус-сенсибилизации должна быть подтверждена клиническими данными, показывающими эффективную профилактику резус-сенсибилизации у резус-отрицательных беременных женщин с резус-положительным плодом.

Особенности проведения доклинических и клинических исследований препаратов иммуноглобулинов человека специфических

Проведение фармацевтических и биологических исследований, ДИ и КИ специфических иммуноглобулинов должно проводиться с учетом особенностей, связанных как с природой их получения из плазмы крови человека, так и с особенностями их применения с целью до- и послеэкспозиционной профилактики инфекционного заболевания.

Специфические иммуноглобулины человека (СИГЧ) могут быть получены в производственном масштабе из плазмы крови специально вакцинированных добровольцев, находящихся под наблюдением. В качестве СИГЧ могут быть также использованы препараты из плазмы донорской крови, отобранной для производства препаратов нормального иммуноглобулина, с установленным стандартизированным количеством антител к антигену определенного возбудителя. По такой технологии получают СИГЧ против стафилококковой инфекции на станциях переливания крови.

Свойства препарата СИГЧ должны быть изучены перед ДИ и КИ. Качество препаратов СИГЧ должно соответствовать требованиям ОФС.1.8.1.0003.15 «Иммуноглобулины человека» [5].

До середины прошлого века пассивная иммунизация сыворотками, ИГЧН и СИГЧ была единственным способом предотвращения развития тяжелых инфекционных заболеваний. Дозировки СИГЧ для профилактики и лечения были установлены на основе ДИ и клинического применения в основном в шестидесятых годах прошлого века. В настоящее время СИГЧ попрежнему остаются важным дополнительным средством профилактики инфекционных заболеваний.

Сведения о протективном эффекте антител, составляющих СИГЧ, и накопленный в мире опыт применения СИГЧ для лечения и профилактики различных форм инфекционных заболеваний и сепсиса противоречивы [15, 17, 18]. ВОЗ рекомендованы исключительно для профилактического применения в установленных дозировках СИГЧ только против гепатита В, бешенства и столбняка, как временное средство пассивного иммунитета при отсутствии передачи защитных антител от матери плоду, а также с целью снижения концентрации токсинов или возбудителей инфекции в месте повреждения при раневых инфекциях [36].

Программа ДИ СИГЧ соответствует общим требованиям к препаратам ИГЧН с учетом пути введения.

При разработке нового препарата, внесении изменений, существенным образом изменяющих технологический процесс или расширении рекомендаций по применению СИГЧ, целесообразно проведение КИ. В связи с единым источником получения, принятой технологией производства и охватом населения иммунизацией КИ СИГЧ имеют общие характерные особенности.

КИ I фазы проводят с целью изучения фармакокинетики нового препарата. При внутривенном введении в фармакокинетическом эксперименте строят фармакокинетическую кривую зависимости концентрации в плазме от времени после введения, оценивают $T_{1/2}$, AUC, V_d и K_{el}. При внесосудистом введении (внутримышечном или подкожном) дополнительно изучают параметры, характеризующие абсорбцию препарата (C_{max}, T_{max}, AUC). Анализ антигенов и антител проводят валидированными методами. Допускается сравнение фармакокинетических данных с данными литературы, без использования в клиническом исследовании препарата сравнения [26].

Результаты этих КИ общепризнанно принимают в качестве результатов исследований эффективности и считают распространяемыми на все этнические группы, женщин и детей, в том числе с учетом этических соображений. Одновременно результаты этих исследований служат для оценки реактогенности, переносимости и безопасности.

КИ с целью подбора оптимальных дозировок и кратности лечения, а также с целью оценки профилактической и/или лечебной эффективности препарата обычно не проводят. КИ II фазы проводят только при необходимости значительного отступления от доз, регламентированных международными организациями. Новые показания вводятся на основании собственных клинических исследований.

При наличии международных рекомендаций для определенных СПИГ, например, для иммуноглобулинов человека против гепатита В, их следует использовать при разработке программы КИ [26].

Особые требования к регистрационному досье и план управления рисками

При регистрации ЛП, полученного из крови, плазмы крови человека, в составе регистрационного досье должны быть представлены дополнительно [11]:

1) в разделе документации административного характера документ, содержащий информацию о субъектах обращения донорской крови и (или) ее компонентов, о том, где была осуществлена донация (крови и (или) плазмы крови), а также данные об инфекционных заболеваниях, передающихся парентеральным путем, информация о субъектах обращения донорской крови и (или) ее компонентов, в отношении которых осуществляется контроль донорской крови и (или) ее компонентов;

2) в разделе химической, фармацевтической и биологической документации:

а) критерии и способы отбора, транспортирования и хранения донорской крови и (или) ее компонентов;

б) результаты исследований отобранных донорской крови и (или) плазмы крови и пулов на наличие возбудителей инфекций, включая информацию об использованных методиках исследований и в случае исследования пулов плазмы крови результаты документального подтверждения (валидации) использованных методик;

в) технические характеристики упаковки для отбора донорской крови и (или) плазмы крови, включая информацию об использованных растворах антикоагулянтов.

При государственной регистрации препаратов ИГЧ заявитель обязан включить в раздел документации административного характера регистрационного досье, представляемого в форме общего технического документа, план управления рисками, содержащий подробное описание мероприятий по фармаконадзору, направленных на выявление, оценку и предотвращение или минимизацию рисков, связанных с ЛП, включая оценку эффективности данных мероприятий [11].

План управления рисками может включать следующую информацию [7]:

– сводную информацию о безопасности ЛС;

– представление документов, содержащих результаты мониторинга безопасности ЛП 1 раз в 6 мес. в течение первых двух лет после выдачи регистрационного удостоверения, 1 раз в год в течение последующих двух лет, далее каждые 5 лет;

– мероприятия по предотвращению и снижению рисков;

– планы по проведению мероприятий по изучению эффективности и безопасности ЛП;

– факторы риска возникновения нежелательных реакций на ЛП;

– критерии эффективности мероприятий по снижению рисков;

– другие мероприятия.

При подтверждении государственной регистрации заявитель обязан представить результаты осуществления мероприятий в соответствии с планом управления рисками. Отсутствие или неполное представление указанной информации является основанием для отказа в проведении экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения ЛП.

Заключение

Разработка и обоснование программы клинической разработки ЛП ИГЧ входит в компетенцию заявителя. В Российской Федерации практически отсутствуют специальные руководства и регламентирующие документы по планированию программ доклинического и клинического изучения новых препаратов ИГЧ и оценок их результатов. Указанные причины делают целесообразным в данной ситуации заимствование опыта зарубежных регуляторов в этой области. При этом анализ регламентирующих документов должен сопоставляться с отечественной законодательной базой. Наиболее четко очерченными и понятными как для разработчиков, так и экспертов, оценивающих результаты, являются требования европейского регулятора (EMA). Кроме того, документы EMA легли в основу разработанных нормативных правовых актов в сфере обращения ЛС в рамках ЕАЭС.

Выполнение данных рекомендаций при планировании и проведении ДИ и КИ, а также при разработке ИМП ЛП ИГЧ, в частности показаний к применению, позволит экспертам не только объективно оценить представленные материалы при регистрации ЛП в Российской Федерации, но и в дальнейшем заявителям препарата пройти процедуру взаимного признания в ЕАЭС.

Список литературы / References

1. Государственный реестр лекарственных средств Министерства здравоохранения Российской Федерации. URL: http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx (дата обращения: 17.04.2017). [State Register of Medicines of the Ministry of Health of the Russian Federation. (In Russ.). Available from: http://grls.rosminzdrav.ru/grls.aspx, accessed 17.04.2017].

2. Иванов В., Мосягин В., Вдовиченко М., Кудашева Э., Бондарев В., Борисевич И. Иммуноглобулин человека нормальный: эффективность и безопасность применения // Врач, 2015. № 11. С. 17-20. [Ivanov V., Mosyagin V., Vdovichenko M., Kudasheva E., Bondarev V., Borisevich I. Human normal immunoglobulin drugs: issues of efficiency and safety of medical use. *Vrach = The Doctor, 2015, no. 11, pp. 17-20.* (In Russ.)]

3. Иммуноглобулин человека нормальный для внутривенного введения: ФС.3.3.2.0008.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т. III. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#1244 (дата обращения: 17.04.2017). [Human normal immunoglobulin for intravenous administration: FS.3.3.2.0008.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition, Vol. III. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#1244, accessed 17.04.2017].

4. Иммуноглобулин человека нормальный: ФС.3.3.2.0007.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т. III. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#1238 (дата обращения: 17.04.2017). [Human normal immunoglobulin: FS.3.3.2.0007.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition, Vol. III. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_3_html/HTML/#1238, accessed 17.04.2017].

5. Иммуноглобулины человека: ОФС.1.8.1.0003.15 // Государственная фармакопея Российской Федерации XIII изд. Т. II. URL: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/#880 (дата обращения: 17.04.2017). [Human immunoglobulins: OFS.1.8.1.0003.15. State Pharmacopoeia of the Russian Federation, XIII edition, Vol. II. Available from: http://193.232.7.120/feml/clinical_ref/pharmacopoeia_2_html/HTML/#880, accessed 17.04.2017].

6. Лазаренко А.А., Алимбарова Л.М., Мордвинцева Э.Ю., Баринский И.Ф. Разработка свечевой формы препарата иммуноглобулинов человека с высокими титрами антител к вирусам простого герпеса 1-го и 2-го типов для лечения хронических форм герпетической болезни // Вопросы вирусологии, 2017. Т. 62, № 3. С. 36-41. [Lazarenko A.A., Alimbarova L.M., Mordvintseva E.Yu., Barinsky I.F. Development of the suppository form of human immunoglobulin preparation with high titers of antibodies to herpes simplex virus types 1 and 2 for the treatment of chronic forms of herpetic disease. *Voprosy virusologii = Problems of Virusology, 2017, Vol. 62, no. 3, pp. 36-41.* (In Russ.)]

7. Меркулов В.А., Бунятян Н.Д., Сакаева И.В., Лепахин В.К., Романов Б.К., Ефремова Т.А. Новые законодательные инициативы по повышению безопасности лекарственных средств в Европейском Союзе // Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения, 2013. № 3. С. 45-48. [Merkulov V.A., Bunyatyan N.D., Sakaeva I.V., Lepakhin V.K., Romanov B.K., Yefremova T.A. New legislative initiatives to improve drug safety in the European Union. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Product, 2013, no. 3, pp. 45-48.* (In Russ.)]

8. Нормативные правовые акты в сфере обращения лекарственных средств в рамках Евразийского экономического союза. Т. 2. Разработка и проведение исследований лекарственных средств. М.: Ремедиум, 2017. 308 с. [Regulations on medicines circulation within the Eurasian Economic Union. Vol. 2. Development and testing of medicines]. Moscow: Remedium, 2017. 308 p.

9. О внесении изменений в Федеральный закон «Об обращении лекарственных средств»: Федеральный закон № 429-ФЗ от 22.12.2014. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_172505/ (дата обращения: 17.04.2017). [On amendment of the Federal Law "On circulation of medicines": Federal Law No. 429-FZ of 22.12.2014. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_172505/, accessed 17.04.2017].

10. О порядке определения взаимозаменяемости лекарственных препаратов для медицинского применения: постановление Правительства Российской Федерации от 28.10.2015 № 1154. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_188118/ (дата обращения: 17.04.2017). [On the procedure of determination of medicines interchangeability: Resolution of the Government of the Russian Federation No. 1154 of 28.10.2015. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_188118/, accessed 17.04.2017].

11. Об обращении лекарственных средств: Федеральный закон № 61-ФЗ от 12.04.2010. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/ (дата обращения: 17.04.2017). [On circulation of medicines: Federal Law No. 61-FZ of 12.04.2010. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_99350/, accessed 17.04.2017].

12. Об утверждении правил надлежащей клинической практики: приказ Минздрава России от 01.04.2016 № 200н. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_203764/ (дата обращения: 17.04.2017). [On adoption of the Good Clinical Practice standard: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 200n of 01.04.2016. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_203764/, accessed 17.04.2017.

13. Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики: приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 199н от 01.04.2016. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_203348/ (дата обращения: 17.04.2017). [On adoption of the Good Laboratory Practice standard: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 199n of 01.04.2016. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_203348/, accessed 17.04.2017].

14. Об утверждении требований к инструкции по медицинскому применению лекарственных препаратов: приказ Минздрава России от 21.09.2016 № 724н. URL: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_205739/ (дата обращения: 17.04.2017). [On adoption of the requirements for the patient information leaflet: Order of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 724n of 21.09.2016. Available from: http://www.consultant.ru/document/cons_doc_LAW_205739/, accessed 17.04.2017].

15. Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Воробьева М.С., Саркисян К.А., Рукавишников А.В., Бондарев В.П., Шевцов В.А. Опыт изучения экстренной профилактики и лечения клещевого энцефалита специфическим иммуноглобулином человека // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований, 2016. № 8-2. С. 162-170. [Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Vorobieva M.S., Sarkisyan K.A., Rukavishnikov A.V., Bondarev V.P., Shevtsov V.A. Evaluation of extra prophylaxy and treatment of tick-borne encephalitis by human specific immunoglobulin. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental`nykh issledovaniy = International Journal of Applied and Fundamental Research, 2016, no. 8-2, pp. 162-170.* (In Russ.)]

16. Олефир Ю.В., Меркулов В.А., Мосягин В.Д., Вдовиченко М.В., Иванов В.Б., Кудашева Э.Ю., Бондарев В.П., Борисевич И.В. Препараты иммуноглобулина человека нормального: эволюция взглядов на показания к применению // Фарматека, 2015. № 20 (313). С. 32-37. [Olefir Yu.V., Merkulov V.A., Mosyagin V.D., Vdovichenko M.V., Ivanov V.B., Kudasheva E.Yu., Bondarev V.P., Borisevich I.V. Human normal immunoglobulin drugs: the evolution of views on therapeutic indications. *Farmateka = Pharmateka, 2015, no. 20 (313), pp. 32-37.* (In Russ.)]

17. Перекрест В.В., Мовсесянц А.А., Мухачева А.В., Шевцов В.А., Шведов Д.В., Борисевич И.В. Препараты для специфической профилактики натуральной оспы, зарегистрированные в Российской Федерации // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение, 2013. № 2 (46). С. 4–13. [Perekrest V.V., Movsesyants A.A., Mukhacheva A.V., Shevtsov V.A., Shvedov D.V., Borisevich I.V. Preparations for the specific prophylaxis of smallpox approved in the Russian Federation. *BIOpreparati. Profilaktika, diagnostika, lechenie = Biopreparation. Prevention, Diagnosis, Treatment, 2013, no. 2 (46), pp. 4-13.* (In Russ.)]

18. Профилактика клещевого вирусного энцефалита: санитарно-эпидемиологические правила СП 3.1.3.2352-08. URL: http://www.centrsolo.ru/userfiles/editor/files/Norm_dokumenti/S_P_3.1.3.2352-08%20.pdf (дата обращения: 17.04.2017). [Prevention of tick-borne viral encephalitis: Sanitary and Epidemiological Requirements SP 3.1.3.2352-08. Available from: http://www.centrsolo.ru/userfiles/editor/files/Norm_dokumenti/S_P_3.1.3.2352-08%20.pdf, accessed 17.04.2017].

19. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств (Иммунобиологические лекарственные препараты). Ч. 2. М.: Гриф и К., 2013. 536 с. [Guideline on the conduct of non-clinical trials of medicines (immunobiological medicines). P. 2]. Moscow: Grif i K., 2013. 536 p.

20. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К, 2013. 328 с. [Guideline on expert evaluation of medicines. Vol. I]. Moscow: Grif i K., 2013. 328 p.

21. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. III. М.: Гриф и К, 2014. 344 с. [Guideline on expert evaluation of medicines. Vol. III]. Moscow: Grif i K., 2014. 344 p.

22. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. IV. М.: Гриф и К, 2014. 172 с. [Guideline on expert evaluation of medicines. Vol. IV.]. Moscow: Grif i K., 2014. 172 p.

23. Appropriate uses of human immunoglobulin in clinical practice: Memorandum from an IUIS/WHO meeting. *Bulletin WHO, 1982, Vol. 60, no. 1, pp. 43-47.*

24. Guideline on core SmPC for human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg): EMA/CHMP/BPWP/94038/2007 Rev. 5. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/12/WC500219036.pdf (Accessed 04.05.2017).

25. Guideline on core SmPC for human normal immunoglobulin for subcutaneous and intramuscular administration: EMA/CHMP/BPWP/143744/2011 Rev. 1. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/03/WC500184870.pdf (Accessed 17.04.2017).

26. Guideline on the clinical investigation of hepatitis B immunoglobulins: EMA/CHMP/BPWP/585257/2009. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/07/WC500190207.pdf (Accessed 17.04.2017).

27. Guideline on the clinical investigation of human anti-D immunoglobulin for intravenous and/or intramuscular use: EMA/CPMP/BPWG/575/99, rev. 1]. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500003334.pdf (Accessed 06.02.2017).

28. Guideline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for subcutaneous and/or intramuscular administration (SCIg/IMIg):EMA/CHMP/BPWP/410415/2011 Rev. 1 URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2015/07/WC500190211.pdf (Accessed 17.04.2017).

29. Guideline on the clinical investigation of human normal immunoglobulin for intravenous administration (IVIg): EMA/CHMP/BPWP/94033/2007 Rev. 3. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/12/WC500219039.pdf (Accessed 04.05.2017).

30. Guideline on the core SmPC for human Anti-D immunoglobulin for intramuscular use: EMA/CHMP/BPWP/29205/2005 Rev. 2 URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/09/WC500213199.pdf (Accessed 17.04.2017).

31. Guideline on the core SmPC for human Anti-D immunoglobulin for intravenous use: EMA/CHMP/BPWP/319619/2005 Rev. 2 URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2016/09/WC500213200.pdf (Accessed 17.04.2017).

32. Immune Globulin (Human). URL: http://www.fda.gov/downloads/BiologicsBloodVaccines/BloodBloodProducts/ApprovedProducts/LicensedProductsBLAs/FractionatedPlasmaProducts/UCM371376.pdf (Accessed 17.04.2017).

33. Perez E.E., Orange J.S., Bonilla F., Chinen J., Chinn I.K., Dorsey M., El-Gamal Y., Harville T.O., Hossny E., Mazer B., Nelson R., Secord E., Jordan S.C., Stiehm E.R., Vo A.A., Ballow M. Update on the use of immunoglobulin in human disease: A review of evidence. *J. Allergy Clin. Immunol., 2017, Vol. 139, no. 3, pp. 1-46.*

34. Recommendations for the production, control and regulation of human plasma for fractionation. WHO Techn. Rep. Ser., 2007, no. 941. URL: http://www.gmpua.com/Process/Blood/TRS941Annex4blood.pdf (Accessed 17.04.2017).

35. Study of Octanorm subcutaneous IG in patients with PID. URL: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01888484?term=octanorm&rank=1 (Accessed 17.04.2017).

36. WHO. Immunization, vaccines and biologicals: vaccine position papers. URL: http://www.who.int/immunization/documents/positionpapers/en/ (Accessed 17.04.2017).

Авторы:

Иванов В.Б. *— д.м.н., профессор, заместитель начальника управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Мосягин В.Д. *— д.м.н., профессор, начальник управления экспертизы аллергенов, цитокинов и других иммуномодуляторов Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Кудашева Э.Ю. *— к.м.н., начальник лаборатории иммуноглобулинов и препаратов крови Испытательного центра экспертизы качества медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Олефир Ю.В. *— д.м.н., старший научный сотрудник, генеральный директор ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Меркулов В.А. *— д.м.н., профессор, заместитель генерального директора по экспертизе лекарственных средств ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Борисевич И.В. *— д.м.н., профессор, директор Центра планирования и координации научно-исследовательских работ ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Бондарев В.П. *— д.м.н., профессор, директор Центра экспертизы и контроля медицинских иммунобиологических препаратов ФГБУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Authors:

Ivanov V.B.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Head, Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and Other Immunomodulators, Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Mosyagin V.D.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Division for Expert Evaluation of Allergenes, Cytokines and Other Immunomodulators, Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Kudasheva E.Yu.*, PhD (Medicine), Head, Laboratory of Immunoglobulins and Blood Products of the Testing, Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Olefir Yu.V.*, PhD, MD (Medicine), Senior Research Associate, Director-General, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Merkulov V.A.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Deputy Director-General for Medicinal Products' Evaluation, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Borisevitch I.V.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Centre for Planning and Coordination of Scientific Activities, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Bondarev V.P.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Director, Centre for Evaluation and Control of Medicinal Immunobiological Products, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow, Russian Federation*

Поступила 09.06.2017
Принята к печати 21.06.2017

Received 09.06.2017
Accepted 21.06.2017

ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТОВ КВЕРЦЕТИНА ДИГИДРАТА В МОДЕЛИ ОВА-ИНДУЦИРОВАННОЙ РЕСПИРАТОРНОЙ АЛЛЕРГИИ У МЫШЕЙ

Кенкишвили А.О.[1], Албегова Д.З.[1], Лаптев О.С.[1, 2], Павлова С.И.[2, 3], Албегова Ж.К.[4], Козлов И.Г.[1, 2]

[1] ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия
[2] ФГБУ «Федеральный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», Москва, Россия
[3] ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», г. Чебоксары, Россия
[4] ФГБОУ ВО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, г. Владикавказ, Россия

Резюме. В моделях *in vivo* исследовали влияние кверцетина дигидрата (КД) на течение респираторной аллергии у мышей. Для провокации аллергии вводили сывороточный овальбумин на разных сроках. После введения КД на стадии ОВА-сенсибилизации изменялся баланс Т-хелперных цитокинов (снижался IL-2 и повышался уровень IFNγ), снижался сывороточный уровень аллерген-специфических IgG1, IgE и повышался IgG2a. На стадии провокации респираторной аллергии, за счет внутривенного введения КД, уменьшалась воспалительная инфильтрация легочной ткани и изменялся состав бронхоальвеолярной лаважной жидкости, снижался уровень IgG1 и IgE на фоне повышения IgG2a.

Ключевые слова: флавоноиды, респираторная аллергия, иммуносупрессия

STUDY OF QUERCETIN DIHYDRATE EFFECTS IN A MODEL OF OVA-INDUCED RESPIRATORY ALLERGY IN MICE

Kenkishvili A.O.[a], Albegova D.Z.[a], Laptev O.S.[a, b], Pavlova S.I.[b, c], Albegova G.K.[d], Kozlov I.G.[a, b]

[a] Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation
[b] Federal D. Rogachev Research and Clinical Center for Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow, Russian Federation
[c] Chuvash State I.N. Ulianov University, Cheboksary, Russian Federation
[d] North Ossetia State Medical Academy, Ministry of HealthCare, Vladikavkaz, Russian Federation

Abstract. We have investigated *in vivo* effects of quercetin dihydrate (QD) upon course of respiratory allergy produced in experimental murine model. To provoke allergy, serum ovalbumin (OVA) was injected at different

Адрес для переписки:
Лаптев Олег Сергеевич
ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, 1.
Тел.: 8 (495) 434-44-92.
E-mail: xynon@mail.ru

Address for correspondence:
Laptev Oleg S.
Russian National N.I. Pirogov Research Medical University
117997, Russian Federation, Moscow, Ostrovityanova str., 1.
Phone: 7 (495) 434-44-92.
E-mail: xynon@mail.ru

Образец цитирования:
А.О. Кенкишвили, Д.З. Албегова, О.С. Лаптев, С.И. Павлова, Ж.К. Албегова, И.Г. Козлов «Исследование эффектов кверцетина дигидрата в модели ОВА-индуцированной респираторной аллергии у мышей» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 629-634. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-629-634

© Кенкишвили А.О. и соавт., 2017

For citation:
A.O. Kenkishvili, D.Z. Albegova, O.S. Laptev, S.I. Pavlova, G.K. Albegova, I.G. Kozlov "Study of quercetin dihydrate effects in a model of OVA-induced respiratory allergy in mice", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 629-634. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-629-634

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-629-634

terms. Following administration of QD at the stage of OVA sensitization, the balance of T-helper cytokines was changed (IL-2 was decreased along with increased IFNγ) accompanied by decreased allergen-specific IgG1, IgE and increased IgG2a in blood serum. At the stage of boosting the respiratory allergy, intravenous administration of QD caused reduction of inflammatory lung infiltration, and composition of bronchoalveolar lavage fluid was altered, i.e., IgG1 and IgE showed a decrease, along with higher IgG2a levels.

Keywords: flavonoids, respiratory allergy, immunosuppression

Введение

Исследования, проведенные в последние десятилетия, выявили ключевое значение различных иммунологических нарушений в механизмах развития или запуска ряда патологических состояний. На базе расшифровки «молекулярного портрета» болезней и синдромов, сформировалась идеология прицельной (таргетной) фармакотерапии, способной селективно корригировать ключевые звенья патогенеза того или иного заболевания. Так, во второй половине XX в. принципиальные изменения произошли в подходах к иммуносупрессивной терапии в связи с выявлением молекулярных маркеров заболеваний, характеризующихся иммуноагрессией. Разработка высокоселективных и менее токсичных иммуносупрессивных средств является одним из перспективных направлений этой области.

В медицинской практике средства растительного происхождения всегда занимали важное место. Флавоноиды относятся к полифенольным соединениям, обнаруживаемым практически во всех высших растениях. Эти вещества обладают широким диапазоном активностей: в системе *x* угнетают разнообразные ферменты животных и человека, а *in vivo* проявляют противовоспалительные, иммунотропные, антиканцерогенные и другие эффекты [1, 2]. Изучение механизмов действия флавоноидов на молекулярном уровне показывает, что некоторые их классы способны эффективно ингибировать фосфорилирование, а, как следствие, и активацию, ключевых молекул сигнальных путей в клетках. Исходя из этих фактов, есть предположение о том, что такие соединения могут обладать иммуномодулирующими свойствами.

Было доказано, что полифенольные соединения возможно использовать при бронхиальной астме, так как флавоноиды потенцируют изопротеренол-индуцированную релаксацию гладкой мускулатуры в дыхательных путях [3].

Материалы и методы

В нашем исследовании мы рассмотрели влияние кверцетина дигидрата (КД) на течение респираторной аллергии у мышей. Кверцетина дигидрат – порошок желтого цвета, полностью растворяется в 96% этаноле, при разбавлении дистиллированной водой получается раствор желтого цвета без примесей и хлопьев. Молекулярная масса КД – 302 г/моль.

В экспериментах *in vivo* исследуемые агенты вводили внутривенно или внутрибрюшинно в дозе 10^{-5} моль/кг в изотоническом растворе натрия хлорида с 5% содержанием этанола. Мышам контрольной группы вводили соответствующие объемы растворителя.

В исследовании были использованы мыши линий Balb/c (самки весом 18-20 г, возраст 8-10 недель), полученные из питомника РАМН (Крюково, Московская область). Животные содержались на стандартном пищевом рационе вивария при свободном доступе к воде и пище. Экспериментальные группы животных формировали рандомизированно по 8 мышей в каждой. В исследование были включены следующие группы:

1. Отрицательный контроль (K^-) – интактные мыши.

2. Положительный контроль (K^+) – группы мышей, которые получали объемы растворителя, соответствующие исследуемым агентам.

3. (КД1) – группа мышей, которым внутривенно вводили кверцетина дигидрата (КД) в дозе 10^{-5} моль/кг через 4 и 24 ч после каждой сенсибилизации.

4. (КД2) – группа мышей, которым внутривенно вводили КД в дозе 10^{-5} моль/кг за 1 ч до каждой провокации.

Продукцию цитокинов оценивали на стадии сенсибилизации иммунокомпетентными клетками, а на эффекторной стадии клеточный состав бронхоальвеолярной лаважной жидкости (БАЛ) и уровни сывороточных овальбумин (ОВА)-специфических иммуноглобулинов в подопытных (КД1, 2) и контрольных группах.

С целью моделирования аллергии мышей-самок линии Balb/c 3-кратно сенсибилизировали внутрибрюшинным введением адсорбированного на корпускулярном носителе (алюминиевые квасцы, в качестве адъюванта) куриного ОВА (10,0 мкг/мышь, 200 мкл) на 0, 14 и 21 дни эксперимента. Затем вводили интрафарингеально 1% раствор ОВА в стерильном фосфатно-солевом буфере (ФСБ) трехкратно на 29, 31 и 39 дни для провокации респираторной аллергии.

Мышей из исследуемых групп выводили из опыта через 26 ч после 2-кратной сенсибилизации ОВА часть и эксплантировали селезенки. В 96-луночные планшеты засевали выделенные спленоциты, стимулировали добавлением КонА и инкубировали при 37 °С, 100% влажности и 5% CO_2. Через 24 и 48 ч после инкубации исследовали уровни цитокинов в супернатантах. При помощи цитофлуориметрического метода определяли концентрации IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFNγ, TNFα, GM-CSF.

Для подтверждения возможности влияния КД на патогенез аллергии в сыворотке крови мышей было необходимо определить уровни аллерген-специфических иммуноглобулинов: IgE, IgG1 и IgG2a классов. Для этого через 48 ч после введения последней разрешающей дозы ОВА у мышей под эфирным наркозом забирали кровь пункцией нижней полой вены. Полученную кровь оставляли при комнатной температуре до образования плотного сгустка и центрифугированием отделяли сыворотку, которую хранили при -70 °С до анализа. Определение содержания овальбумин (ОВА)-специфических иммуноглобулинов (IgG1, IgG2a и IgE) в сыворотке крови мышей проводили методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА). С этой целью 96-луночный иммунологический микропланшет для ИФА покрывали раствором овальбумина в концентрации 5 мкг/мл в ФСБ, оставляя на ночь при 4 °С. После чего для блокировки участков неспецифической сорбции раствор овальбумина заменяли на ФСБ, содержащий 10% эмбриональной телячьей сыворотки и инкубировали в течение часа при 4 °С. После проведения реакции лунки четырехкратно отмывали ФСБ, содержащим 0,25% Твин-20. Затем добавляли исследуемую мышиную сыворотку в разведении, начиная с 1:250, и после инкубации (12 ч) повторно четырехкратно отмывали раствором Твина-20 в ФСБ. Иммобилизованные иммуноглобулины класса IgG определяли при помощи козьих антител против мышиных IgG1 и IgG2a, конъюгированных с пероксидазой хрена, инкубируя в течение 1,5 часа при комнатной температуре. При определении ОВА-специфических IgE последовательно добавляли биотинилированные козьи антитела против мышиных IgE и коньюгат пероксидазы хрена со стрептавидином. На последнем этапе в лунки микропланшета вносили по 100 мкл субстратного раствора, содержащего тетраметилбензидин и перекись водорода. Ферментативную реакцию проводили в течение 10-15 мин, останавливая добавлением в каждую лунку по 100 мкл стоп-раствора. Результат выражали в процентах.

Одновременно с забором крови для получения сыворотки через 48 ч после последней ОВА-провокации у мышей проводили БАЛ, которая после использовалась для дифференциального подсчета клеток. Для дифференциального подсчета готовили цитологические препараты, которые окрашивали и под иммерсионным объективом подсчитывали в нескольких полях зрения эозинофилы, нейтрофилы, макрофаги/моноциты и лимфоциты. В одном препарате анализировали общее количество клеток (не менее 200-300), рассчитывая процентное соотношение каждой популяции.

Статистическую обработку результатов проводили путем расчета средней арифметической и средней ошибки средней арифметической. Для оценки достоверности различий использовали t-критерий Стьюдента, разницу считали достоверной при $p < 0,05$.

На стадии сенсибилизации оценивали цитокиновый профиль спленоцитов под влиянием КД при индукции иммунного ответа. Для этого через 26 ч после двукратной сенсибилизации ОВА часть мышей из группы КД1 и соответствующей им группы положительного контроля ($К^+$) выводили из опыта и эксплантировали селезенки с последующим добавлением КонА. Через 24 и 48 ч после инкубации исследовали уровни цитокинов в супернатантах. Концентрации IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-17, IFNγ, TNFα, GM-CSF определяли цитофлуориметрическим методом. Пиковые концентрации цитокинов определяли к 48 ч инкубации спленоцитов.

Результаты

Как показало исследование, в супернатантах, полученных при инкубации КонА-стимулированных спленоцитов мышей из группы $К^+$, определялись IL-2, IL-4, IL-6, IFNγ и TNFα.

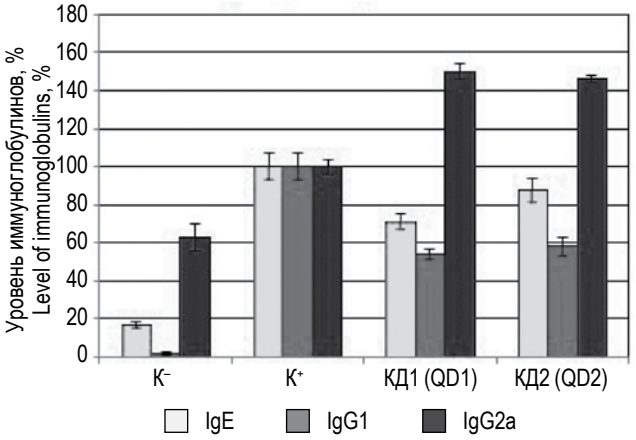

Рисунок 1. Уровни (в процентах) сывороточных аллерген-специфических иммуноглобулинов через 48 ч после последней провокации мышей с OBA-индуцированной респираторной аллергией

Примечание. K^- – интактные мыши. K^+ – положительный контроль. КД1 – введение кверцетина дигидрата через 4 и 24 ч после сенсибилизации. КД2 – введение кверцетина дигидрата за 1 ч до провокации. Достоверные изменения по отношению к положительному контролю ($p < 0,05$).

Figure 1. Levels of serum allergen-specific immunoglobulins 48 hours after the last challenge of mice with OVA-induced respiratory allergy (per cent)

Note. K^- , intact mice; K^+, positive control. QD1, administration of quercetin dihydrate at 4 and 24 h after sensitization. QD2, introduction of quercetin dihydrate for 1 h before challenge. Significant changes with respect to positive control ($p < 0.05$).

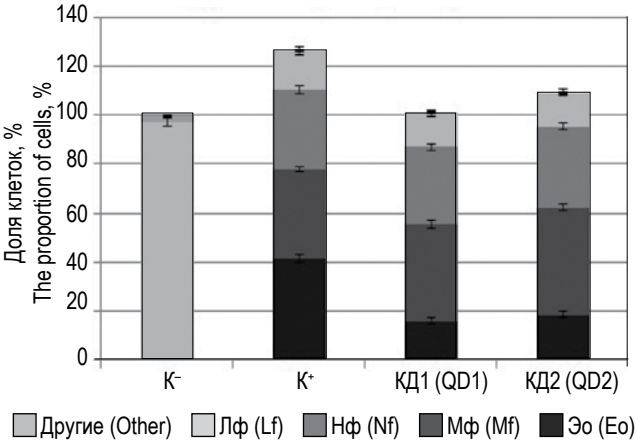

Рисунок 2. Долевое распределение эозинофилов (Эо), макрофагов (Мф), нейтрофилов (Нф) и лимфоцитов (Лф) в бронхоальвеолярной лаважной жидкости, полученной через 48 ч после последней провокации мышей с OBA-индуцированной респираторной аллергией

Примечание. K^- – интактные мыши. K^+ – положительный контроль. КД1 – введение кверцетина дигидрата через 4 и 24 ч после сенсибилизации. КД2 – введение кверцетина дигидрата за 1 ч до провокации.

Figure 2. Shared distribution of eosinophils (Eo), macrophages (Mf), neutrophils (Nf), and lymphocytes (Lf) in bronchoalveolar lavage fluid obtained 48 hours after the last challenge of mice with OVA-induced respiratory allergy

Note. K^-, intact mice; K^+, positive control. QD1, administration of quercetin dihydrate at 4 and 24 h after sensitization; QD2, infusion of quercetin dihydrate for 1 h before the challenge.

Внутривенное введение КД в дозе 10^{-5} моль/кг через 4 и 24 ч после сенсибилизации приводило к статистически значимым изменениям средних значений для IL-2, IL-6 и IFNγ. Средний уровень IFNγ в группе КД был значительно выше по сравнению с контрольной группой (1025,4±3,5 пг/мл *vs* 120,5±3,5 пг/мл), был также выше контрольных значений уровень IL-6 (96,5±4,5 пг/мл *vs* 95,3±3,7 пг/мл). Напротив, продукция IL-2 на фоне введения в группе КД (72,6±2,5 пг/мл) была ниже, чем в группе K^+ (125,6±4,5 пг/мл). IL-17 не определялся в группах K^+ и КД. Значимых различий для IL-4 и IFNα не наблюдалось в исследуемых группах.

На эффекторной стадии, как говорилось ранее, определяли аллерген-специфические иммуноглобулины. Результаты определения представлены на рисунке 1. В группе положительного контроля (K^+) средний уровень OBA-специфического IgG1 был значительно выше в сравнении с группой интактных мышей (100,0±7,0% *vs* 1,9±1,0%, $p < 0,05$).

Уровень OBA-специфического IgG1 как после сенсибилизации, так и до провокации (КД1 и КД2) составлял 54,0±3,0% и 58,0±5,0% соответственно, что было достоверно ($p < 0,05$) ниже, чем в группе K^+. Среднее значение IgG2a в группах КД соответствовало показателю оптической плотности КД1 – 150,0±4,0%, КД2 – 146,0±2,0%.

На фоне терапии КД значение IgE также изменялось. После сенсибилизации в группе КД1 снижался уровень IgE: 71,0±4,0% ($p < 0,05$), в группе КД2 замечалась выраженная, но статистически недостоверная тенденция к снижению этого показателя по сравнению с контрольным уровнем 87,5±6,0%.

Клеточный состав БАЛ определяли на эффекторной стадии. В сравнении с группой отрицательного контроля (K^-) абсолютное количество клеток БАЛ было значимо больше в группе по-

ложительного контроля K^+: среднее значение ($\times 10^6$ клеток/мышь) достигало 1,57±0,13, тогда как для интактных мышей этот показатель был 0,39±0,05. Общая «клеточность» БАЛ в группе КД1 была сравнима с таковой для K^+ и составила $1,53\pm0,11 \times 10^6$ клеток/мышь, тогда как в группе КД2 величина этого показателя была достоверно ниже (0,79±0,14, $p < 0,05$).

Клеточный состав БАЛ интактных мышей был преимущественно представлен лимфоидными клетками с полным отсутствием эозинофильных гранулоцитов. На рисунке 2 представлено долевое распределение клеток (эозинофилов, нейтрофилов, макрофагов/моноцитов и лимфоцитов) в БАЛ контрольных и опытных групп. Как мы можем заметить, процентное содержание клеток в БАЛ различалось в группах K^+ и КД1 (введение препарата после сенсибилизации): доля эозинофилов в этих группах составила 41,7±1,43% и 16,1±1,45% соответственно. В группе КД2 (введение препарата до провокации) наблюдалось статистически достоверное снижение количества эозинофилов, процентная доля которых равнялась 18,7±1,4% ($p < 0,05$), что происходило за счет нарастания доли моноцитов/макрофагов и других клеток.

Заключение

Подводя итоги, исследования эффектов КД в модели ОВА-индуцированной респираторной аллергии у мышей, мы можем заключить следующее:

– Внутривенное введение КД на стадии ОВА-сенсибилизации изменяет баланс Т-хелперных цитокинов (проявляет тенденцию к снижению продукции спленоцитами IL-2 и повышает уровень IFNγ), снижает сывороточные уровни аллерген-специфических IgG1, IgE и повышает IgG2a.

– Внутривенное введение КД на стадии провокации аллергии ОВА способствует уменьшению воспалительной инфильтрации легочной ткани и изменяет состав БАЛ (по сравнению с K^+ менее выраженное снижение эозинофилии за счет нарастания макрофагов и других клеток), а также понижает уровень сывороточного аллерген-специфического IgG1 и вызывает тенденцию к снижению IgE на фоне повышения IgG2a.

Множество научных исследований рассматривают нарушение баланса Th1/Th2 хелперных популяций как предпосылки развития аллергических заболеваний [4]. Так, кверцетин способен снижать цитокины и подавлять IL-4, снижать образование антител IgE. Кверцетин является основным ингредиентом многих потенциальных противоаллергических препаратов и пищевых добавок, он более компетентный в отношении ингибирования IL-8 и IL-6, чем кромогликат (противоаллергическое лекарство) [5].

В ходе эксперимента по изучению влияния введения КД на БАЛ было установлено, что исследуемый агент уменьшает воспалительную инфильтрацию легочной ткани и изменяет состав БАЛ.

Подводя итоги, можно сделать вывод, что при введении КД изменяется спектр цитокинов (уменьшается содержание IL-2 и увеличивается IFN). Это может говорить о возможности исследуемого агента переключать Th2-иммунный ответ на формирование антагонистичных популяций Th1-/Th17-лимфоцитов.

Список литературы / References

1. Bosch R., Philips N., Suárez-Pérez J.A., Juarranz A., Devmurari A., Chalensouk-Khaosaat J., González S. Mechanisms of photoaging and cutaneous photocarcinogenesis, and photoprotective strategies with phytochemicals. *Antioxidants (Basel), 2015, Vol. 4, no. 2, pp. 248-268.*

2. Camps-Bossacoma M., Abril-Gil M., Saldaña-Ruiz S., Franch À. Cocoa diet prevents antibody synthesis and modifies lymph node composition and functionality in a rat oral sensitization model. *Nutrients, 2016, Vol. 8, no. 4, p. 242.*

3. Elizabeth A., Charles W., Emala Sr. Quercetin acutely relaxes airway smooth muscle and potentiates β-agonist-induced relaxation via dual phosphodiesterase inhibition of PLCβ and PDE4. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol., 2013, Vol. 305, no. 5, L396-403.*

4. Kapsenberg M.L., Jansen H.M., Bos J.D., Wierenga E.A. Role of type 1 and type 2 T helper cells in allergic diseases. *Curr. Opin. Immunol., 1992, Vol. 4, no. 6, pp. 788-793.*

5. Mlcek J., Jurikova T., Skrovankova S., Sochor J. Quercetin and its anti-allergic immune response. *Molecules, 2016, Vol. 21, no. 5, pii: E623.* doi: 10.3390/molecules21050623.

Авторы:

Кенкишвили А.О. *— аспирант кафедры фармакологии ПФ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Албегова Д.З. *— к.м.н., доцент кафедры фармакологии ПФ ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Лаптев О.С. *— аспирант лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ «Федеральный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева»; ассистент кафедры фармации ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ, Москва, Россия*

Павлова С.И. *— д.м.н., профессор, заведующая кафедрой фармакологии, клинической фармакологии и биохимии ФГБОУ ВПО «Чувашский государственный университет им. И.Н. Ульянова», Чебоксары; к.м.н., доцент, старший научный сотрудник лаборатории экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ «Федеральный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», Москва, Россия*

Албегова Ж.К. *— д.м.н., профессор, Кафедра фармакологии, ФГБОУ ВО Северо-Осетинская государственная медицинская академия Минздрава России, Владикавказ, Россия*

Козлов И.Г. *— д.м.н., профессор, заведующий кафедрой фармакологии ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ; заведующий лабораторией экспериментальной и клинической фармакологии ФГБУ «Федеральный научно-практический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Д. Рогачева», Москва, Россия*

Authors:

Kenkishvili A.O.*, Postgraduate Student, Department of Pharmacology, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation*

Albegova D.Z.*, PhD (Medicine), Associate Professor, Department of Pharmacology, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation*

Laptev O.S.*, Postgraduate Student, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Federal D. Rogachev Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology; Assistant Professor, Department of Pharmacy, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University, Moscow, Russian Federation*

Pavlova S.I.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pharmacology, Clinical Phermacology and Biochemistry, Chuvash State I.N. Ulianov University, Cheboksary; PhD (Medicine), Associate Professor, Senior Research Associate, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Federal D. Rogachev Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russian Federation*

Albegova G.K.*, PhD, MD, Professor (Medicine), Department of Pharmacology, North Ossetia State Medical Academy, Ministry of HealthCare, Vladikavkaz, Russian Federation*

Kozlov I.G.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Pharmacology, Russian National N.I. Pirogov Research Medical University; Chief, Laboratory of Experimental and Clinical Pharmacology, Federal D. Rogachev Research and Clinical Centre of Pediatric Hematology, Oncology, and Immunology, Moscow, Russian Federation*

Поступила 15.09.2016
Отправлена на доработку 19.09.2016
Принята к печати 27.12.2016

Received 15.09.2016
Revision received 19.09.2016
Accepted 27.12.2016

ИЗУЧЕНИЕ АПОПТОЗА ИММУННЫХ КЛЕТОК ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА

Овсепян Л.М.[1], Казарян Г.С.[1], Зангинян А.В.[1], Акопджанян А.А.[1], Захарян Г.В.[1], Петрек Мартин[2]

[1] *Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения*

[2] *Университет Палацкого, Оломоуц, Чешская Республика*

Резюме. Сахарный диабет 1 типа (СД-1) характеризуется прогрессирующей деструкцией β-клеток поджелудочной железы. Ведущими звеньями в патогенезе диабета являются дисрегуляция иммунитета и программированная гибель клеток. В данной статье изучены особенности экспрессии генов IL-2, белка Bcl-1 и аннексина 11 у больных СД-1. Исследование проведено на 70 здоровых людях и 30 больных СД-1. Обратную транскрипцию проводили ПЦР с помощью Transcriptor first strand cDNK synthesis Kit.

Изучение уровня экспрессии гена IL-2 и белка Bcl-1 в лейкоцитах периферической крови показало, что медианные уровни экспрессии гена IL-2 и белка Bcl-1 повышены у больных СД-1 по сравнению с контрольной группой. Изучение апоптоза с помощью аннексинового теста обнаружило повышенный уровень экспрессии аннексина 11 у больных СД-1. Полученные данные могут служить дополнительным источником для понимания механизмов патогенеза СД-1.

Ключевые слова: диабет, лейкоциты, интерлейкин-2, аннексин, пролиферация, апоптоз

STUDY OF APOPTOSIS OF IMMUNE CELLS IN TYPE 1 DIABETES MELLITUS

Hovsepyan L.M.[a], Kazaryan G.S.[a], Zanginyan A.V.[a], Akopdzhanyan A.A.[a], Zakharyan G.V.[a], Petrek M.[b]

[a] *Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia*

[b] *Palacky University, Olomouc, Czech Republic*

Abstract. Type 1 diabetic mellitus (T1DM) is known to be associated with progressive destruction of β-cells of the pancreas. Dysregulated immunity and programmed cell death are an important link in pathogenesis of diabetes. In this study, we examined expression levels of interleukin-2, Bcl-1, ANXA-11 genes in patients with T1DM. The study was done with blood leukocures of T1DM patients (30) and healthy controls (70).

Адрес для переписки:
Овсепян Лаура Михайловна
Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения
Тел.: +0374 (091) 14-64-88.
E-mail: lhovsep@mail.ru

Address for correspondence:
Hovsepyan Laura M.
Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia
Phone: +0374 (091) 14-64-88.
E-mail: lhovsep@mail.ru

Образец цитирования:
Л.М. Овсепян, Г.С. Казарян, А.В. Зангинян, А.А. Акопджанян, Г.В. Захарян, Мартин Петрек «Изучение апоптоза иммунных клеток при сахарном диабете 1 типа» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 635-640.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-635-640
© Овсепян Л.М. и соавт., 2017

For citation:
L.M. Hovsepyan, G.S. Kazaryan, A.V. Zanginyan, A.A. Akopdzhanyan, G.V. Zakharyan, Martin Petrek "Study of apoptosis of immune cells in type 1 diabetes mellitus", Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 635-640.
doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-635-640
DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-635-640

Reverse-transcription PCR was done with Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit from Roche Life Science. The study of IL-2 and Bcl-1 gene expression level in peripheral blood leukocytes indicated that the median gene expression levels of IL-2 and Bcl-1 are increased in patients with T1DM patients compared with control group of healthy persons.

The study of apoptosis by annexin test has revealed an increased level of ANXA 11 expression in T1DM patients. The obtained data can serve as an additional source for understanding the pathogenesis of T1DM mechanisms.

Keywords: diabetes, leukocytes, interleukin-2, annexin, proliferation, apoptosis

Введение

Сахарный диабет (СД) представляет собой заболевание, проявляющееся яркими нарушениями углеводного и энергетического обмена, сопровождающееся дисбалансом всех функциональных систем организма в результате хронической гипергликемии.

Считается, что сахарный диабет 1 типа (СД-1) является органоспецифическим аутоиммунным заболеванием, которое развивается в результате селективного разрушения β-клеток поджелудочной железы цитотоксическими лимфоцитами, Т-хелперами 1 типа и аутоантителами [1]. В результате постепенной деструкции β-клеток наступает инсулиновая недостаточность, приводящая к расстройству гомеостаза глюкозы и возникновению СД-1. Считается, что одним из механизмов развития СД-1 является дефект Т-регуляторной системы, в частности дисбаланс между $CD4^+$ эффекторами и $CD8^+$Т-лимфоцитами [6].

Ведущими звеньями в патогенезе аутоиммунного поражения β-клеток поджелудочной железы являются процессы инициации и реализации апоптоза.

Несмотря на активное изучение иммунопатогенеза СД-1, многие ключевые моменты в развитии и прогрессировании данного заболевания остаются неясными.

Целью настоящего исследования явилось изучение особенностей экспрессии генов интерлейкина-2 (IL-2), белка Bcl-1(bcl-1) и аннексина 11 (ANXA -11) у больных СД 1 типа.

Материалы и методы

Исследование проведено на 70 здоровых людях и 30 больных сахарным диабетом 1 типа. Все обследованные были этническими армянами, проживающими на территории Армении. Все они были проинформированы врачами о предстоящем исследовании и дали согласие на взятие крови. Исследование одобрено Комитетом по этике Института молекулярной биологии НАН РА.

Забор крови проводили натощак. Кровь брали в вакуумные пробирки, содержащие в качестве антикоагулянта ЭДТА. Для выделения лейкоцитов к 5 мл цельной крови добавляли 10 мл лизирующего раствора, включающего в свой состав (155 мМ NH_4Cl, 10 мМ $KHCO_3$ и 0,1 мМ Na_2ЕДТА, pH = 7).

Полученный осадок лимфоцитов дважды промывали PBS (фосфатно-солевого буфера, pH = 7,4), а затем хранили при -20 °С в растворе, состоящем из 100 мкл RNAlater и 50 мкл PBS.

Выделение РНК из лимфоцитов, проводили при использовании комерческого набора реагентов (“High pure mRNA Isolation Kit”; Roche Applied Science, Германия). Выделенную РНК

ТАБЛИЦА 1. ЗОНДЫ И ПРАЙМЕРЫ, ИСПОЛЬЗОВАННЫЕ ПРИ КОЛИЧЕСТВЕННОМ АНАЛИЗЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

TABLE 1. PROBES AND PRIMERS USED IN QUANTITATIVE ANALYSIS OF GENE EXPRESSION LEVEL

Ген Gene	**Правый праймер** Right primer	**Левый праймер** Left primer	**Номер зонда** Probe No.	**Изготовитель** Manufacturer
IL2	5’-aagtgaaagtttttgctttgagc	5’-aggccacagaactgaaacatc	#65	Roche
ANXA11	5’-tcttccccagacacacacc	5’-ggccttcttgctgcttcata	#29	Roche
Bcl-2	5’-ttatttcatgaggcacgttattattag	5’acagaggatcatgctgtacttaaaaa	#6	IDT
RPL32	5’-gcgatctcggcacagtaag	5’-gaagttcctggtccacaacg	#17	IDT

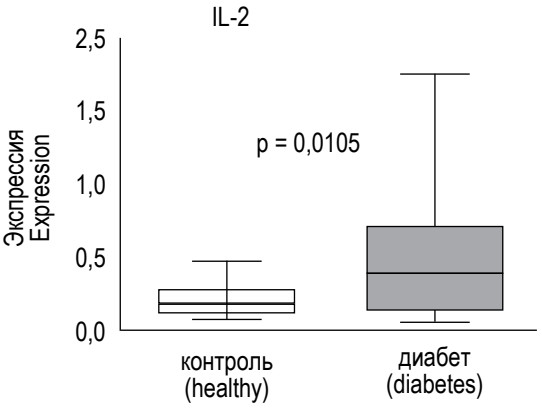

Рисунок 1. Уровень экспрессии IL-2 у здоровых и больных СД-1, выраженной в медианах

Figure 1. Expression level of IL-2 in healthy and type 1 diabetes patients, expressed median shown

хранили при -80 °С до обратной транскрипции ПЦР.

Обратную транскрипцию проводили ПЦР с помощью Transcriptor first strand cDNA synthesis Kit согласно инструкции протокола. Полученные кДНК хранили при -30 °С [11].

RPL32 использовали в качестве контрольного гена для ПЦР в реальном времени. Информация о праймерах – в таблице 1.

ПЦР в реальном времени и предварительный анализ полученных результатов были сделаны на системе RotorGene 3000 (Corbett Research, Sydney, Australia).

Для статистической обработки данных использовали программу GraphPad Prizm 5 Demo (http://www.graphpad. com). Результаты представлены в виде среднего арифметического ± стандартной ошибки (M±m). При установлении достоверности различий данных использовали t-критерий Стьюдента и U-критерий Манна–Уитни.

Значение $p < 0,05$ рассматривалось как статистически достоверное.

Результаты и обсуждение

Сравнительное изучение уровня экспрессии гена IL-2 в лейкоцитах периферической крови показало, что медианные уровни экспрессии гена IL-2 повышены у больных СД-1 по сравнению со здоровыми (рис. 1).

IL-2 обладает выраженной способностью индуцировать активность практически всех клонов цитотоксических клеток. Он был первым интерлейкином, у которого была выявлена эта способность. IL-2 повышает цитолитическую функцию Т-киллеров и NK-клеток, увеличивает продукцию перфоринов и IFNγ этими клетками, активирует моноциты и макрофаги, которые повышают синтез и секрецию TNFα, IL-1β, IL-6, IL-8. Основными продуцентами IL-2 являются активированные Т-хелперы 1-го класса. Главное действие, оказываемое им на Т-лимфоциты, – индукция пролиферации в результате преодоления точки рестрикции между фазами цикла G1a и G1b [7].

Интерес вызывает участие этого цитокина в процессе апоптоза. Обнаружено, что для реализации апоптозиндуцирующего эффекта IL-2 на лимфоциты крови в условиях *in vitro* необходим определенный порог концентрации цитокина. Наличие подобного «барьера» действия IL-2 может быть объяснено строением его рецептора и работой внутриклеточных сигнальных путей. Согласно некоторым исследователями, указанный цитокин вызывает повышение чувствительности Т-лимфоцитов к апоптозу, что зависит от уровня антигенного и костимулирующего воздействия; IL-2 человека оказывает также дозозависимые эффекты на реализацию апоптоза иммунокомпетентных клеток: количество апоптотических клеток в культуре лимфоцитов изменяется однонаправленно с концентрацией цитокина в диапазоне 0,1-1,0 нг/мл [4]. Существует множество причин отмены апоптоза данным цитокином. Одна из них – способность данного цитокина запускать пролиферативный каскад по MAPK-сигнальным путям, сходящимся на регуляции экспрессии гена bcl-2, результатом повышения которой является клеточное выживание и пролиферация. Дозозависимый характер этого явления может быть объяснен увеличением количества активированных IL-2R с повышением дозы цитокина и усилением интенсивности антиапоптотических сигнальных путей в клетке [4].

В литературе имеются противоречивые сведения о повышении или снижении продукции уровня IL-2 при СД-1. У больных с недавно диагностированным СД-1 отмечается более высокий уровень циркулирующего IL-2 в периферической крови по сравнению с длительно текущим СД 1 типа и здоровыми.

В то же время имеются работы, в которых сообщается о снижении продукции уровня IL-2 в крови и его продукции активированными мононуклеарами у больных СД-1 [10].

Одним из важных регуляторов апоптоза являются белки семейства bcl-2.

Bcl-2 является внутриклеточным белком, локализующимся на митохондриях, поэтому появ-

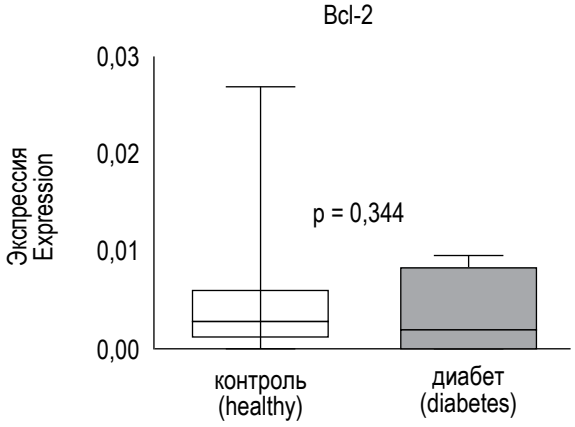

Рисунок 2. Уровень экспрессии Bcl-2 у здоровых и больных СД-1, выраженной в медианах

Figure 2. The level of Bcl-2 expression in healthy and type 1 diabetes patients, expressed median shown

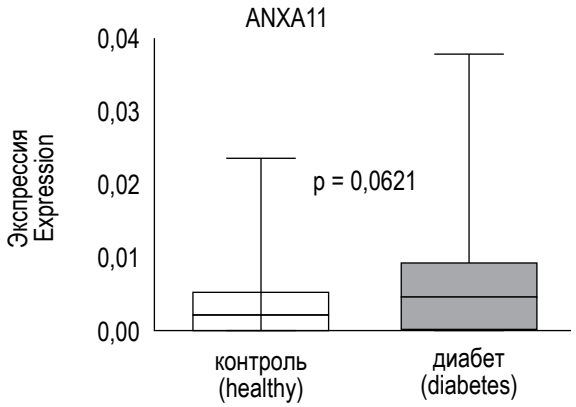

Рисунок 3. Уровень экспрессии ANXA-11 у здоровых и больных СД-1, выраженной в медианах

Figure 3. Expression level for ANHA-11 in healthy and type 1 diabetes patients, expressed median

ление его растворимой формы в крови связано с повреждением клеточной мембраны в результате процесса апоптоза.

Как показали результаты наших исследований (рис. 2), при СД-1 наблюдается повышение в крови экспрессии белка bcl-2. Повышенная экспрессия bcl-2 повышает выживаемость клеток, индуцированных к апоптозу. Bcl-2 взаимодействует с Apaf-1 и каспазой-9 и блокирует дальнейшую передачу апоптотического сигнала [13].

Механизмы, с помощью которых модулируется апоптотический процесс, неизвестны, и предлагается несколько противоречивых теорий о способах действия белков семейства bcl-2. Одна из теорий основана на блокаде апоптоза bcl-2 путем изменения митохондриальных функций.

Митохондриальный сигнальный путь апоптоза реализуется в результате выхода апоптогенных белков из межмембранного пространства митохондрий в цитоплазму клетки, который может осуществляться за счет повышения проницаемости митохондриальной мембраны, приводящей к открытию высокопроницаемых каналов на внешней мембране митохондрий. Разрыв внешней мембраны митохондрий объясняется увеличением объема митохондриального матрикса. Данный процесс связывают с раскрытием пор митохондриальной мембраны, приводящим к снижению мембранного потенциала и высокоамплитудному набуханию митохондрий [2].

Апоптоз, наряду с пролиферацией, является формой ответа зрелых лимфоцитов на патологию, эти реакции альтернативны, их параллельная оценка может дать более полные сведения о состоянии изучаемых клеток [5].

В этой связи нами был изучен уровень аннексина 11 в лимфоцитах больных СД-1. Как показали результаты исследования (рис. 3), нами обнаружен повышенный уровень экспрессии аннексина 11 по сравнению с контрольной группой.

Аннексин-11 не выделяется из нормальных клеток, источником внеклеточного аннексина являются апоптотические и разрушенные клетки [12]. В механизме действия аннексина большое значение имеет их свойство связываться с отрицательно заряженными фосфолипидами – фосфатидилсерином (ФС) и кардиолипином (КЛ), экспозиция которых на клеточной мембране является одним из ранних признаков апоптоза [8].

Результаты наших прежних исследований, посвященных исследованию перекисей липидов и содержания фосфолипидов, показали уменьшение ФС и КЛ при аллоксановом диабете и активирование процессов свободнорадикального окисления липидов [3].

Наиболее легко подвергаются свободнорадикальному окислению кислые фосфолипиды. Образование гидроперекисей ФС и КЛ нарушает его взаимодействие с белками цитоскелета аннексинами и облегчает миграцию окисленного ФС с внутренней стороны мембранного бислоя на наружную. По этой причине ФС, который в нормальной клетке практически полностью локализован с внутренней стороны бислоя, при индукции апоптоза начинает проявляться и с внешней стороны мембраны [2]. Экспрессия фосфатидилсерина на наружной поверхности мембраны наблюдается, начиная с ранней стадии апоптоза до полной деградации клетки.

КЛ в основном содержится на внутренней стороне мембраны митохондрий и играет специфическую роль в функционировании митохондрий за счет взаимодействия с рядом митохондриальных белков, а также в регуляции активностей ферментных систем дыхательной цепи. Известно, что АТФ-АДФ-синтетаза находится в окружении КЛ, отщепление КЛ сопровождается торможением активности цитохромоксидазы, активности сукцинатдегидрогеназы, расстройством структурной организации НАДН-дегидрогеназы.

В нормальных условиях КЛ удерживают цитохром С. При активации свободнорадикального окисления в митохондриях кардиолипины окисляются и освобождают цитохром С. После выхода в цитоплазму он образует комплекс с фактором активации апоптоза (ApaF-1), активирующей нижестоящие каспазы, которые осуществляют апоптоз клеток [9].

Таким образом, полученные нами результаты позволяют считать, что у больных СД-1 отмечается повышение экспрессии генов IL-2, Bcl-2 и Anxa-11. Нам представляется, что дисбаланс между пролиферацией и программированной гибелью клетки приводит к нарушению регуляторной функции цитокинов, что является патологичным звеном в патогенезе СД-1, что, скорее всего, связано с компенсаторной реакцией организма на активацию иммунной системы и апоптоза.

Обобщая результаты проведенного исследования, можно заключить, что изучение экспрессии отмеченных генов важно с точки зрения раскрытия иммунопатогенеза СД-1 и определения их прогностической значимости в процессе проведении лечения. Нами было выявлено, что у больных с СД-1, наряду с изменением процесса пролиферации, отмечались разной степени выраженности изменения апоптотической гибели лимфоцитов крови. Обнаруженные закономерности реализации апоптотической гибели иммунных клеток могут являться результатом модулирующего влияния IL-2 и Bc1-1 и определяются дозой цитокинов.

Список литературы / References

1. Балаболкин М.И. Диабетология. М.: Медицина, 2004. 383 с. [Balabolkin M.I. Diabetology]. Moscow: Medicine, 2004. 383 p.

2. Бра М., Квинан Б., Сузин С.А. Митохондрии в программированной гибели клетки: различные механизмы гибели // Биохимия, 2005. Т. 70, № 2. С. 284-293. [Bra M., Kvinan B., Suzin S.A. Programmed cell death *via* mitochondria: Different modes of dying. *Biokhimiya = Biochemistry, 2005, Vol. 70, no. 2, pp. 231-239.* (In Russ.)]

3. Карян Ш.С., Овсепян, Л.М., Захарян Г.В., Карагезян К.Г. Особенности нормализующего действия лазерного излучения при нарушениях метаболизма фосфолипидов и процессов перекисеобразования у аллоксандиабетических белых крыс // Информационные технологии и управление, 2003. Т. 2. С. 212-218. [Karyan Sh.S., Hovsepyan L., Zakharyan G., Karagezyan K.G. Specifities of laser irradiation normalizing effect at disturbances of phospholipid metabolism and peroxideformation processes of alloxandiabeted rats. *Informatsionnye tekhnologii i upravlenie = Informaton Technologies and Management 2003, Vol. 2, pp. 212-218.* (In Russ.)]

4. Саприна Т.В., Лазаренко Ф.Э., Прохоренко Т.С., Рязанцева Н.В., Новицкий В.В. Особенности продукции интерлейкина-2 мононуклеарными лейкоцитами крови при аутоиммунном сахарном диабете // Сибирский медицинский журнал, 2011. Т. 26, № 4. С. 65-70. [Saprina T.V., Lazarenko F.E., Prokhorenko T.S., Ryazantseva N.V., Novitsky V.V. Peculiariries of production and reception features of interleukin 2 by mononuclear leukocytes in autoimmune diabetes mellitus. *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal = Siberian Medical Journal, 2011, Vol. 26, no. 4, pp. 65-70.* (In Russ.)]

5. Ярилин А.А., Никонова М.Ф., Ярилина А.А., Варфоломеева М.И., Григорьева Т.Ю. Апоптоз,роль в патологии и значимость его оценки при клиникоиммунологическом обследовании больных // Медицинская иммунология, 2000. Т. 2, № 1. С. 7-16. [Yarilin A.A., Nikonova M.F., Yarilina A.A., Varfolomeeva M.I., Grigorieva T.Yu. Apoptosis, importance of its evaluation in immunopatological states. *Meditsinskaya immunologiya = Medical Immunology (Russia), 2000, Vol. 2, no. 1, pp. 7-16.* (In Russ.)]

6. Cnop M., Welsh N., Jonas J.C., Jörns A., Lenzen S., Eizirik D.L. Mechanisms of pancreatic beta-cell death in type 1 and type 2 diabetes: many differences, few similarities. *Diabetes, 2005, Vol. 54, pp. 97-107.*

7. Eguchi Katsumi, Kawakami A. Involvement of apoptotic cell death in autoimmune diseases. *Medical Electron Microscopy, 2002, Vol. 35, Issue 1, pp. 1-8.*

8. Fadok V., Rose D. M., Pearson A. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature, 2000, Vol. 405, pp. 85-90.*

9. Green D.R. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell, 2005, Vol. 121, pp. 671-674.*

10. Hussain M.J., Maher J., Warnock T., Vats A., Peakman M., Vergani D. Cytokine overproduction in healthy first degree relatives of patients with IDDM. *Diabetologia, 1998, Vol. 41. no. 3, pp. 343-349.*

11. Mull A. Reverse transcription: do the fip. *Nat. Rev. Moll. Cell Biol., 2008, Vol. 9, pp. 501-505.*

12. Wang J.,Guo C., Liu S., Yin Y., Liang R., Sun M.Z., Frederick G. Annexin A-11 in disease. *Clin. Chim. Acta, 2014, Vol. 431, pp. 164-168.*

13. Xu H., Chen Y., Li Y., Xia F., Han B., Zhang H., Zhai H., Wu H., Li Y., Lu Y. Mitochondrial apoptosis of lymphocyte is induced in type 2 diabetes. *Chin. Med. J. (Engl.), 2014, Vol. 127, no. 2, pp. 213-217.*

Авторы:

Овсепян Л.М. *— к.б.н., ведущий научный сотрудник, руководитель лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения*

Казарян Г.С. *— к.б.н., научный сотрудник лаборатории лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения*

Зангинян А.В. *— к.б.н., научный сотрудник лаборатории лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения*

Акопджанян А.А. *— к.б.н., научный сотрудник лаборатории лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения*

Захарян Г.В. *— к.б.н., научный сотрудник лаборатории лаборатории молекулярной мембранологии, Институт молекулярной биологии Национальной академии наук Республики Армения, г. Ереван, Республика Армения*

Петрек Мартин *— заведующий лабораторией патофизиологии, Университет Палацкого, Оломоуц, Чешская Республика*

Authors:

Hovsepyan L.M.*, PhD (Biology), Leading Research Associate, Chief, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia*

Kazaryan G.S.*, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia*

Zanginyan A.V.*, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia*

Akopdzhanyan A.A.*, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia*

Zakharyan G.V.*, PhD (Biology), Research Associate, Laboratory of Molecular Membranology, Institute of Molecular Biology, National Academy of Sciences, Republic of Armenia, Yerevan, Republic of Armenia*

Petrek Martin*, Head of Laboratory, Department of Pathophysiology, Palacky University, Olomouc, Czech Republic*

Поступила 25.01.2017
Отправлена на доработку 09.02.2017
Принята к печати 27.02.2017

Received 25.01.2017
Revision received 09.02.2017
Accepted 27.02.2017

Медицинская иммунология
2017, Т. 19, № 5, стр. 641-646
© 2017, СПб РО РААКИ

Краткие сообщения
Short communications

Medical Immunology (Russia)/
Meditsinskaya Immunologiya
2017, Vol. 19, № 5, pp. 641-646
© 2017, SPb RAACI

ОСОБЕННОСТИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ, ХРОНИЧЕСКИМ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ И РАКОМ ЖЕЛУДКА

Смирнова О.В., Цуканов В.В., Синяков А.А.

ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия

Резюме. Хронический гастрит – наиболее распространенное заболевание желудочно-кишечного тракта. Одной из важных эпидемиологических особенностей хронических гастритов является их предраковый потенциал. Несомненна роль иммунной системы в трансформации предракового состояния в рак. В связи с этим целью нашей работы явилось изучение спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим поверхностным гастритом, хроническим атрофическим гастритом и раком желудка.

В работе приведены результаты комплексного лабораторного обследования больных с хроническим гастритом (ХГ) общей численностью 85 человек, 25 пациентов с хроническим атрофическим гастритом (ХАГ) и 50 больных раком желудка (РЖ) в возрасте от 19 до 70 лет. Контрольной группой служили 115 практически здоровых доноров без гастроэнтерологических жалоб в возрасте от 19 до 67 лет. Объектом исследования была венозная кровь, которая бралась из локтевой вены в пробирки Vacutainer с раствором гепарина натрия (5 ЕД/ мл) до начала патогенетического лечения. Оценку спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL 3606” (Россия). В нашем исследовании у больных РЖ выявляются однонаправленные изменения в хемилюминесцентной активности НГ. При спонтанной и индуцированной хемилюминесценции НГ диагностируется уменьшение активности фагоцитов, при этом увеличение времени выхода на максимум и площади под кривой спонтанной и индуцированной ХЛ, свидетельствует, что при сниженной функции фагоцитов им требуется больше времени для активации.

У больных ХГ активность НГ не нарушена, однако аналогично изменены время выхода на максимум и площадь под кривой ХЛ.

В группе больных ХАГ хемилюминесцентная активность НГ повышена, а учитывая аналогичные изменения во времени выхода на максимум ХЛ и площади под кривой, им также требуется больше времени для активации, и они вырабатывают большее количество активных форм кислорода.

Таким образом, при всех *H. pylori*-ассоциированных заболеваниях НГ требуется больше времени для активации при этом функциональная их активность не нарушена при ХГ, повышена при ХАГ и снижена при РЖ.

Ключевые слова: хемилюминесцентная активность, нейтрофильные гранулоциты, хронический гастрит, рак желудка

Адрес для переписки:
Смирнова Ольга Валентиновна
ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера» СО РАН
660062, Россия, г. Красноярск,
ул. Партизана Железняка, 3г.
Тел.: 8 (913) 567-97-19.
E-mail: ovsmirnova71@mail.ru

Address for correspondence:
Smirnova Olga V.
Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences
660062, Russian Federation, Krasnoyarsk, Partisan Zheleznyak str., 3g.
Phone: 7 (913) 567-97-19.
Email: ovsmirnova71@mail.ru

Образец цитирования:
О.В. Смирнова, В.В. Цуканов, А.А. Синяков «Особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим гастритом, хроническим атрофическим гастритом и раком желудка» // Медицинская иммунология, 2017. Т. 19, № 5. С. 641-646. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-641-646

© Смирнова О.В. и соавт., 2017

For citation:
O.V. Smirnova, V.V. Tsukanov, A.A. Sinyakov “Features of chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes in patients with chronic gastritis, chronic atrophic gastritis and gastric cancer”, Medical Immunology (Russia)/Meditsinskaya Immunologiya, 2017, Vol. 19, no. 5, pp. 641-646. doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-641-646

DOI: 10.15789/1563-0625-2017-5-641-646

FEATURES OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILIC GRANULOCYTES IN PATIENTS WITH CHRONIC GASTRITIS, CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS AND GASTRIC CANCER

Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Sinyakov A.A.

Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation

Abstract. Chronic gastritis is the most common disease of gastro-intestinal tract. Precancerous potential is among most important epidemiological features of chronic gastritis. Immune system plays a distinct role in transformation from precancerous state to malignancy. In this context, the aim of our work was a study of spontaneous and induced chemiluminescence activity of neutrophilic granulocytes in patients with chronic superficial gastritis, chronic atrophic gastritis and gastric cancer.

The work presents results of comprehensive laboratory examination of patients with chronic gastritis (CG) (a total of 85 persons. 25 patients with chronic atrophic gastritis (CAG), and 50 patients with gastric cancer (GC) at the age of 19 to 70 years were enrolled. Control group included 115 healthy donors without gastrointestinal complaints at the age of 19 to 67 years. The study was performed with venous blood samples taken from cubital vein into Vacutainer tubes with sodium heparin (5 U/mL) prior to starting any pathogenic treatment. Evaluation of spontaneous and induced chemiluminescence was performed for 90 minutes at a 36-channel "CL 3606" chemiluminescence analyzer (Russia). In our study, patients with gastric cancer showed clear unidirectional changes in chemiluminescent activity of neutrophilic granulocytes (NG). When measuring spontaneous and induced NG chemiluminescence, we diagnosed a decreased phagocytic activity characterized by prolonged time-to-peak and area under the curve for spontaneous and induced CL, thus presuming longer activation time required in cases of reduced phagocytic function.

The NG activity in patients with chronic gastritis is not impaired, but, similar changes of time-to-peak and area under were detected. Chemiluminescent activity of NG is increased in the group of CAG patients, and, considering similar changes in activation time and area under the curve, NG also produce greater amount of reactive oxygen species.

Thus, for all H.pylori-associated diseases, the blood NG take longer time to activate, whereas their functional activity is not disturbed in CG, enhanced in CAG patients, and reduced in gastric cancer.

Keywords: chemiluminescence, neutrophilic granulocytes, chronic gastritis, gastric cancer

Введение

Хронический гастрит – наиболее распространенное заболевание желудочно-кишечного тракта [1, 4]. По данным Всемирной организации здравоохранения, хроническим гастритом болеют 80% населения Земли. Считается, что инфекция *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) является одной из распространенных причин возникновения хронического гастрита, и степень выраженности хронического гастрита зависит от вирулентности штаммов *H. pylori*, а развитие атрофии – от генетической предрасположенности и индивидуального ответа на инфицирование *H. pylori* [3, 6, 7, 13]. Возникающие при хроническом гастрите структурные изменения слизистой оболочки желудка приводят к нарушению основных функций желудка. Одной из важных эпидемиологических особенностей хронических гастритов является их предраковый потенциал [2, 8, 15]. Большая роль иммунной системы в прогрессировании патологических процессов и трансформации предракового состояния в рак [5, 9, 10, 11, 14] . Первыми клетками, участвующими в иммунных реакциях, являются нейтрофильные гранулоциты, от активности которых зависит дальнейших исход заболевания [12]. В связи с этим **целью нашей работы** явилось изучение спонтанной и индуцированной хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных хроническим поверхностным гастритом, хроническим атрофическим гастритом и раком желудка.

Материалы и методы

В работе приведены результаты комплексного лабораторного обследования больных с хроническим гастритом (ХГ) общей численностью 85 человек (42 мужчин и 43 женщин) в возрасте от 20 до 70 лет (средний возраст составил 44,7±0,9 лет), 25 пациентов с хроническим атрофическим гастритом (ХАГ) (14 мужчин и 11 женщин) в возрасте от 20 до 70 лет (средний возраст составил 45,1±1,9 лет) и 50 больных раком желудка (РЖ) (33 мужчин и 17 женщин) в возрасте от 19 до 70 лет (средний возраст составил 50,3±2,9 лет). Контрольной группой служили 115 практически здоровых доноров без гастроэнтерологических жалоб (63 мужчин и 52 женщин) в возрасте от 19 до 67 лет (средний возраст 46,8±1,3 лет). Во всех группах исследования была сопоставимость количества молодых и пожилых лиц. Больные

с хроническим гастритом отбирались в гастроэнтерологическом отделении НИИ медицинских проблем Севера, с раком желудка – в КГБУЗ «Красноярский краевой клинический онкологический диспансер им. А.И. Крыжановского».

Исследование проводилось с разрешения этического комитета ФГБНУ «НИИ медицинских проблем Севера» (Протокол №11 от 11.11.2013). В работе с обследованными пациентами соблюдались этические принципы, предъявляемые ст. 24 Конституции РФ и Хельсинкской Декларацией Всемирной медицинской ассоциации. Каждый участник подписывал форму информированного согласия на обследование, подтверждающую его добровольное участие в исследовании.

Диагноз «хронический атрофический гастрит» устанавливался врачом-гастроэнтерологом при фиброэзофагогастродуоденоскопии и морфологическом исследовании слизистой оболочки большой и малой кривизны тела желудка с использованием модифицированной Сиднейской классификации. Во время эндоскопического исследования осуществлялась прицельная биопсия из антрального отдела, большой и малой кривизны тела желудка. Для качественной гистологической оценки срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Диагностика рака желудка (РЖ) проводилась врачами онкологами в Красноярском краевом онкологическом диспансере на основании комплексного инструментального и морфологического обследования. В исследование были включены только больные РЖ II стадии.

Объектом исследования была венозная кровь, которая бралась утром с 8 до 9 часов, натощак, из локтевой вены, в пробирки Vacutainer с разделительным гелем и двойным активатором свертывания (кремнезем) и Vacutainer с раствором гепарина натрия (5 ЕД/ мл).

У всех обследованных пациентов выявляли наличие *H. pylori* серологическим методом с помощью определения титра специфических антител к антигену CagA *H. pylori*. Титры антител к *H. pylori* от 30 EIU и более считали положительным результатом, менее 30 EIU – отрицательным результатом определения *H. pylori*.

В качестве метода изучения активности нейтрофильных гранулоцитов использовался хемилюминесцентный анализ спонтанной и индуцированной продукции АФК НГ. Оценка спонтанной и индуцированной хемилюминесценции осуществляли в течение 90 минут на 36-канальном хемилюминесцентном анализаторе “CL 3606” (Россия). Регистрация результатов и управление анализатором осуществлялись через персональный компьютер. Определялись следующие характеристики: время выхода кривой на максимум интенсивности хемилюминесценции (Tmax), максимальное значение интенсивности хемилюминесценции (Imax), площадь под кривой хемилюминесценции (S). В качестве усилителя хемилюминесценции использовали люминол. Индуктором респираторного взрыва служил опсонизированный зимозан. Усиление хемилюминесценции, индуцированной опсонизированным зимозаном, оценивали по соотношению площади под кривой индуцированной (Sинд) к площади под кривой спонтанной (Sспонт) хемилюминесценции и обозначали индексом активации.

По результатам исследования на персональном компьютере в пакете электронных таблиц MS Excel 2010 была сформирована база данных. Статистическая обработка данных проводилась с помощью пакетов прикладных программ Statistica for Windows 8.0 (StatSoft Inc., США, 2008) и Microsoft Excel, 2007 (Microsoft, США). Обработка полученных данных включала подсчет непараметрических данных: медиану (Me) и персинтили ($Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$). Статистическую значимость различий определяли с использованием рангового критерия Манна–Уитни. Критический уровень значимости при проверки статистических гипотез принимался равным $p < 0,05$.

Результаты

Изучение хемилюминесцентной активности (ХА) нейтрофильных гранулоцитов (НГ) позволит оценить особенности респираторного взрыва неспецифических фагоцитов в спонтанном и индуцированном состоянии при *H. pylori*-ассоциированных заболеваниях. По данным ряда авторов, функциональная активность НГ напрямую зависит от ХА – чем выше ХА НГ, тем больше функциональная способность нейтрофилов.

Интенсивность кривой спонтанной хемилюминесценции (ХЛ) увеличилась у больных хроническим атрофическим гастритом по сравнению с больными хроническим гастритом (ХГ) и контрольной группой (табл. 1). Однако у больных раком желудка она уменьшилась по сравнению со всеми исследуемыми группами.

У больных хроническим гастритом, хроническим атрофическим гастритом и раком желудка время выхода кривой на максимум при спонтанной ХЛ увеличивается по сравнению с контрольной группой, также происходило увеличение времени выхода кривой на максимум у больных ХАГ по сравнению с больными ХГ. У больных раком желудка происходило снижение времени выхода кривой на максимум при спонтанной ХЛ по сравнению с больными ХГ и ХАГ.

Площадь под кривой спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов (НГ) была увеличена в группе больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом по сравнению с контрольной группой, также у больных ХАГ наблюдалось увеличение площади под кривой спонтанной ХЛ НГ по сравнению с ХГ. У больных раком желудка наблюдалось увеличение площади под кривой спонтанной хемилюминесценции нейтрофильных гранулоцитов по сравнению со всеми исследуемыми группами.

ТАБЛИЦА 1. ПОКАЗАТЕЛИ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОЙ АКТИВНОСТИ НЕЙТРОФИЛЬНЫХ ГРАНУЛОЦИТОВ У БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ (ХГ), ХРОНИЧЕСКИМ АТРОФИЧЕСКИМ ГАСТРИТОМ (ХАГ), РАКОМ ЖЕЛУДКА (РЖ) ПО СРАВНЕНИЮ С КОНТРОЛЬНОЙ ГРУППОЙ (Me, $Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

TABLE 1. INDEXES OF CHEMILUMINESCENT ACTIVITY OF NEUTROPHILS IN PATIENTS WITH CHRONIC GASTRITIS (CG), CHRONIC ATROPHIC GASTRITIS (CAG), GASTRIC CANCER (GC) COMPARED WITH THE CONTROL GROUP (Me, $Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$)

Показатели Indexes	**Контроль** Control **N = 100 (1)**		**Больные ХГ** Patients with CG **N = 85 (2)**		**Больные ХАГ** Patients with CAG **N = 25 (3)**		**Больные РЖ** Patients with GC **N = 50 (4)**	
	Me	**$Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$**	**Me**	**$Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$**	**Me**	**$Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$**	**Me**	**$Q_{0,25}$-$Q_{0,75}$**
Imax спонтанная (у.е.) Imax spontaneous (c.u)	19133	27134-3054	21594	29935-4160	22151,1	3456-41726	16687,3	11630-24159
					$p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-4} = 0,007$ $p_{3-4} < 0,001$	
Tmax спонтанная (сек.) Tmax spontaneous (sec.)	969	615-1753	1531	630-2041	1919	1029-2569	1395	1283-1836
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} = 0,008$	
Squr спонтанная (*10^6) Square spontaneous (*10^6)	0,22	0,15-0,54	3	0,9-4,7	3,1	1,09-4,9	5,0	3,39-7,4
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-4} < 0,001$ $p_{3-4} = 0,001$	
Imax индуцированная (у.е.) Imax induced (c.u.)	34940	10488-41588	40329	22205-41661	55269	24967-71740	29803	16689-32635
					$p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$		$p_{2-4} = 0,001$; $p_{3-4} = 0,017$	
Tmax индуцированная (сек.) Tmax induced (sec)	1380,8	796-1586	1544	985-1715	1683	1001-2096	1394	1304-1505
					$p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$		$p_{3-4} = 0,005$	
Squr индуцированная (*10^6) Square induced (*10^6)	0,4	0,15-0,95	3,1	0,51-5,9	5	0,28-10,3	6	5,3-12,8
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} < 0,001$; $p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$; $p_{2-4} < 0,001$	
Индекс активации Activation index	1,3	0,9-2,0	2,61	1,01-3,02	1,86	1,4-2,49	2,69	1,37-3,1
			$p_{1-2} < 0,001$		$p_{1-3} = 0,03$; $p_{2-3} < 0,001$		$p_{1-4} < 0,001$; $p_{3-4} < 0,001$	

Примечание. p_{1-2} – статистически значимые различия между группой больных ХГ и контрольной группой;
p_{1-3}- статистически значимые различия между группой больных ХАГ и контрольной группой;
p_{1-4} – статистически значимые различия между группой больных РЖ и контрольной группой;
p_{2-3} – статистически значимые различия между группой больных ХГ и группой больных ХАГ;
p_{2-4} – статистически значимые различия между группой больных ХГ и группой больных РЖ;
p_{3-4} – статистически значимые различия между группой больных ХАГ и группой больных РЖ.

Note. p_{1-2} is a statistical significant difference between the group of patients with CG and control group;
$p_{1-3,}$ statistically significant differences between the group of patients with CAG and control group;
$p_{1-4,}$ statistically significant differences between the group of patients with GC and a control group;
$p_{2-3,}$ statistically significant differences between the group of patients with CG and the group of patients with CAG;
$p_{2-4,}$ statistically significant differences between the group of patients with CG and the group of patients with GC;
$p_{3-4,}$ statistically significant differences between the group of patients with CAG and a group of patients with gastric GC.

Интенсивность кривой индуцированной ХЛ НГ резко увеличивалась у больных ХАГ по сравнению с контрольной группой и больными хроническим гастритом. У больных раком желудка происходило снижение интенсивности кривой индуцированной ХЛ НГ по сравнению с больными ХГ и ХАГ.

Было зафиксировано увеличение времени выхода кривой на максимум при индуцированной ХЛ у больных ХАГ в сравнении с больными хроническим гастритом и контрольной группой. У больных раком желудка происходило снижение времени выхода кривой на максимум по сравнению с больными ХАГ.

Площадь под кривой индуцированной ХЛ НГ была увеличена в группе больных хроническим гастритом и хроническим атрофическим гастритом по сравнению с контрольной группой, также было выявлено увеличение площади под кривой индуцированной ХЛ НГ у больных ХАГ по сравнению с больными ХГ. В группе больных раком желудка было выявлено увеличение площади под кривой индуцированной ХЛ НГ по сравнению с контрольной группой и группой больных ХГ.

Индекс активации увеличен во всех исследуемых группах по сравнению с контролем ($p_{1-2} < 0,001$, $p_{1-3} = 0,03$, $p_{1-4} < 0,001$), но при этом индекс активации снижается у больных ХАГ по сравнению с ХГ и раком желудка ($p_{2-3} < 0,001$, $p_{3-4} < 0,001$).

Обсуждение

Мы изучили особенности хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных ХГ, ХАГ и РЖ: выявлено одинаковое количество нарушений в хемилюминесцентной активности нейтрофильных гранулоцитов у больных ХАГ и больных РЖ, однако эти изменения были разными.

Угнетение поглотительной способности нейтрофильных гранулоцитов может быть обусловлено исходно низкой функциональной активностью нейтрофилов, что способствовало развитию хронической инфекции. Популяция нейтрофилов неоднородна [18] и отличается по экспрессии рецепторов, уровню окислительного метаболизма, величине мембранного потенциала и фагоцитарной активности. Популяцию нейтрофилов по способности генерировать активные формы кислорода и взаимодействовать с субстратом делят на два класса: нейтрофилы-киллеры и нейтрофилы-кейджеры. Вероятнее всего, при *H. pylori* – инфекции в слизистую оболочку желудка могут мигрировать преимущественно нейтрофилы-киллеры, так как они активно продуцируют АФК и осуществляют фагоцитоз, которыми являются зрелые сегментоядерные нейтрофилы.

В нашем исследовании у больных РЖ происходит уменьшение максимальной интенсивности свечения НГ при спонтанной ХЛ по сравнению со всеми исследуемыми группами, а интенсивность свечения НГ при индуцированной ХЛ уменьшается по сравнению с больными ХГ и ХАГ. У больных РЖ время выхода кривой на максимум при спонтанной ХЛ увеличивается по сравнению с контролем, но снижена по сравнению с больными ХГ и ХАГ. Площадь под кривой при спонтанной ХЛ увеличена по сравнению со всеми исследуемыми группами. Время выхода кривой на максимум при индуцированной ХЛ снижена у больных РЖ по сравнению с больными ХАГ. У больных РЖ происходит повышение площади под кривой при индуцированной ХЛ по сравнению с больными ХГ и контрольной группой. Индекс активации НГ у больных РЖ повышается по сравнению с контрольной группой и больными ХАГ. Таким образом, у больных РЖ выявляются однонаправленные изменения в хемилюминесцентной активности НГ. При спонтанной и индуцированной хемилюминесценции НГ диагностируется уменьшение хемилюминесцентной активности фагоцитов, при этом увеличение времени выхода кривой на максимум и площади под кривой хемилюминесценции в спонтанном и индуцированном состоянии свидетельствует о повышенной продукции активных форм кислорода НГ, то есть при сниженной их функции им требуется больше времени для активации.

У больных ХГ увеличены время выхода кривой на максимум при спонтанной ХЛ, площадь под кривой спонтанной и индуцированной ХЛ и индекс активации нейтрофильных гранулоцитов по сравнению с контролем. Таким образом, у больных ХГ активность НГ не нарушена, однако, учитывая увеличение времени выхода кривой на максимум и площади под кривой при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции, что свидетельствует о повышенной выработке активных форм кислорода НГ, можно предположить, что, несмотря на то, что функция НГ не страдает, им также требуется больше времени для активации.

В группе больных ХАГ происходит увеличение интенсивности, времени выхода кривой на максимум, площади под кривой при спонтанной и индуцированной ХЛ НГ по сравнению с больными ХГ и контрольной группой. У больных ХАГ происходит повышение индекса активации НГ по сравнению с контрольной группой и уменьшение этого индекса по сравнению с больными ХГ. Таким образом, у больных ХАГ хемилюминесцентная активность НГ повышена, а учитывая, что площадь под кривой хемилюминесценции при спонтанной и индуцированной хемилюминесценции увеличена, что свидетельствует о повышенной продукции активных форм кислорода НГ, и увеличены показатели времени выхода кривой на максимум, следовательно, у данных больных НГ характеризуются повышенной активностью и им также требуется больше времени для активации.

Таким образом, при всех *H. pylori* – ассоциированных заболеваниях НГ требуется больше времени для активации при этом функциональная их активность не нарушена при ХГ, повышена при ХАГ и снижена при РЖ.

Список литературы / References

1. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит. Амстердам, 1993. 362 с. [Aruin L.I., Grigoriev P.Ya., Isakov V.A., Yakovenko E.P. Chronic gastritis]. Amsterdam, 1993. 362 p.

2. Бабак О.Я. Современные представления об оценке риска развития и профилактике рака желудка // Сучасна гастроентерологія, 2009. № 6 (50). С. 62-66. [Babak O.Ya. Modern views on risk assessment and prevention of gastric cancer. *Suchasna gastroenterologiya = Current Gastroenterology, 2009, no. 6 (50), pp. 62-66.* (In Russ.)]

3. Бордин Д.С., Машарова А.А., Хомерики С.Г. Хронический гастрит: современный взгляд на старую проблему // Сучасна Гастроентерологія, 2013. № 1 (69). С. 72-79. [Bordin D.S., Masharova A.A., Khomeriki S.G. Chronic gastritis: modern look at an old problem. *Suchasna nastroenterologiya = Current Gastroenterology, 2013, no. 1 (69), pp. 72-79.* (In Russ.)]
4. Гончарик И.И. Хронический гастрит: практ. пособие. Минск: БГМУ. Практ. пособие. Мн.: Ураджай, 2002. 32 с. [Goncharik I.I. Chronic gastritis: Pract. Manua. Minsk: Belarusian State Medical University. Scient. Benefit]. Minsk: Uradzhay, 2002. 32 p.
5. Ивашкин В.Т. Основные понятия и положения фундаментальной иммунологии // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии, 2008. № 4. С. 4-14. [Ivashkin V.T. Basic concepts and provisions of basic immunology. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology, 2008, no. 4, pp. 4-14.* (In Russ.)]
6. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л. и др. Комитет экспертов. Рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых/ Рос. журн. гастроэнт. гепатол. колопроктол, 2012. № 1. С. 87-89. [Ivashkin V.T., Mayev I.V., Lapina T.L. et al. Expert Committee. Recommendations of the Russian Gastroenterological Association on the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* in adult. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii i koloproktologii = Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology and Coloproctology, 2012, no. 1, pp. 87-89.* (In Russ.)]
7. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А., Лапина Т.Л. Хронический гастрит, вызванный инфекцией *Helicobacter pylori*: диагностика, клиническое значение, прогноз. Пособие для врачей. М., 2009. 24 с. [Ivashkin V.T., Sheptulin A.A., Lapina T.L. Chronic gastritis caused by infection with *Helicobacter pylori*: diagnostics, clinical significance, prognosis. Manual for physicians]. Moscow, 2009. 24 p.
8. Маев И.В., Голубев Н.Н. Принципы диагностики и рациональной фармакотерапии хронического гастрита // Сучасна гастроентерологія, 2011. № 1 (57). С. 64-70. [Mayev I.V., Golubev N.N. Principles of diagnostics and rational pharmacotherapy of chronic gastritis. *Suchasna gastroenterologiya = Current Gastroenterology, 2011, no. 1 (57), pp. 64-70.* (In Russ.)]
9. Синяков А.А., Смирнова О.В., Цуканов В.В., Каспаров Э.В., Васютин А.В. Показатели клеточного иммунитета в крови больных атрофическим гастритом // Доктор Ру, 2016. № 1 (118). С. 24-26. [Sinyakov A.A., Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Kasparov E.V., Vasyutin A.V. Indicators of cellular immunity in the blood of patients with atrophic gastritis. *Doktor Ru = Doctor Ru, 2016, no. 1 (118), pp. 24-26.* (In Russ.)]
10. Синяков А.А., Смирнова О.В., Цуканов Э.В., Каспаров Э.В., Васютин А.В. Показатели иммунного статуса в крови у больных атрофическим гастритом // Дневник Казанской медицинской школы, 2016. № 1 (11). С. 29-31. [Sinyakov A.A., Smirnova O.V., Tsukanov E.V., Kasparov E.V., Vasyutin A.V. Indicators of immune status in the blood in patients with atrophic gastritis. *Dnevnik Kazanskoy meditsinskoy shkoly = Diary of the Kazan Medical School, 2016, no. 1 (11), pp. 29-31.* (In Russ.)]
11. Смирнова О.В., Цуканов В.В., Каспаров Э.В., Синяков А.А., Васютин А.В. Особенности неспецифического звена иммунитета у больных хроническим атрофическим гастритом // В мире научных открытий, 2016, № 1 (73). С. 53-74. [Smirnova O.V., Tsukanov V.V., Kasparov E.V., Sinyakov A.A., Vasyutin A.V. Features of non-specific immunity in patients with chronic atrophic gastritis. *V mire nauchnykh otkrytiy = In the World of Scientific Discoveries, 2016, no. 1 (73), pp. 53-74.* (In Russ.)]
12. Чердынцева Н.В., Наумов С.А. Окислительный метаболизм нейтрофильных гранулоцитов крови при предраке и раке желудка // Вопросы онкологии, 1992. Т. 38, № 2. С. 182-187. [Cherdyntseva N.V., Naumov S.A. Oxidative metabolism of blood neutrophilic granulocytes in precancer and cancer of the stomach. *Voprosy onkologii = Problems of Oncology, 1992, Vol. 38, no. 2, pp. 182-187.* (In Russ.)]
13. Шкитин В.А. Роль *Helicobacter pylori* в патологии человека // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2002. Т. 4, № 2. С.128-145. [Shkitin V.A. The role of infection with *Helicobacter pylori* human pathology. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiy = Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, 2002, Vol. 4, no. 2, pp. 128-145.* (In Russ.)]
14. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммунная система желудочно-кишечного тракта: особенности строения и функционирования в норме и патологии // Иммунология, 1997. № 5. С. 4-7. [Khaitov R.M., Pinegin B.V. The immune system of the gastrointestinal tract: features of the structure and functioning in health and disease. *Immunologiya = Immunology, 1997, no. 5, pp. 4-7.* (In Russ.)]
15. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am. J. Surg. Pathol., 1995, Vol. 19, no. 1, pp. 37-43.*

Авторы:

Смирнова О.В. *— д.м.н., заведующая лабораторией клинической патофизиологии ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия*

Цуканов В.В. *— д.м.н., профессор, заведующий клиническим отделением патологии пищеварительной системы ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия*

Синяков А.А. *— младший научный сотрудник ФГБНУ Федеральный исследовательский центр «Красноярский научный центр Сибирского отделения Российской академии наук» Научно-исследовательский институт медицинских проблем Севера, г. Красноярск, Россия*

Authors:

Smirnova O.V.*, PhD, MD (Medicine), Head, Department of Clinical Pathophysiology, Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Tsukanov V.V.*, PhD, MD (Medicine), Professor, Head, Department of Clinical Digestive Pathology, Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Sinyakov A.A.*, Junior Research Associate, Research Institute of Medical Problems of the North, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Krasnoyarsk, Russian Federation*

Поступила 20.01.2017
Отправлена на доработку 26.01.2017
Принята к печати 10.02.2017

Received 20.01.2017
Revision received 26.01.2017
Accepted 10.02.2017

ПРАВИЛА ДЛЯ АВТОРОВ

Статьи представляются в редакцию через систему электронного издательства **(http://mimmun.ru)** в соответствии с требованиями журнала «Медицинская иммунология» и «Инструкцией по подготовке и отправке статьи», представленной на сайте.

С апреля 2016 г. в журнале публикуются статьи на русском и на английском языках.

В журнал принимаются следующие виды публикаций:

Оригинальная статья

Статья должна описывать результаты законченного исследования. Допускается объем статьи до 20 машинописных страниц, включая рисунки, таблицы. Статья должна содержать: 1) введение; 2) материалы и методы; 3) результаты исследований; 4) обсуждение результатов; 5) благодарности.

- **Введение** содержит обоснование цели и задач проведенного исследования.
- **Материалы и методы** могут излагаться в виде отдельных фрагментов с короткими подзаголовками. Все нетрадиционные модификации методов должны быть описаны с достаточной степенью подробности. Для всех используемых в работе реактивов, животных, клеточных культур и т. д. необходимо точно указывать производителей и/или источники получения (с названиями страны, фирмы, института).
- **Результаты** описываются в логической последовательности в виде отдельных фрагментов, разделенных подзаголовками, без элементов обсуждения, без повторения методических подробностей, без дублирования цифровых данных, приведенных в таблицах и рисунках.
- В **обсуждении** проводится детальный анализ полученных данных в сопоставлении с данными литературы, что служит обоснованием выводов и заключений авторов.
- Раздел **«Благодарности»** не является обязательным, но крайне желателен. В этом разделе авторы могут выразить признательность организации, субсидировавшей проведение исследований, коллегам, консультировавшим работу в процессе ее выполнения и/или написания, а также техническому персоналу за помощь в выполнении исследований. Благодарности за предоставление специфических реактивов или оборудования, как правило, помещаются в разделе «Материалы и методы».

Краткие сообщения

Журнал публикует небольшие по объему статьи, которые имеют безусловную новизну и значимость. Эти статьи проходят ускоренное рецензирование и публикуются в короткие сроки. Общий объем краткого сообщения ограничен 8 машинописными страницами, количество рисунков и/или таблиц не может быть более 3, а список использованных литературных источников не должен превышать 15. Титульный лист оформляется, как описано выше. Разделы краткого сообщения аналогичны вышеописанным разделам оригинальной статьи, но не выделяются заголовками и подзаголовками, результаты могут быть изложены вместе с обсуждением.

Обзорные статьи и лекции

Обзорные статьи и лекции в основном заказываются редакцией или могут быть рекомендованы одним из членов редколлегии. Более подробную информацию о правилах оформления этих статей можно узнать в редакции

Библиографические стандарты описания цитируемых публикаций

Описание статьи из журнала:

Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А., Симбирцев А.С. Изучение влияния местного применения рекомбинантного человеческого интерлейкина-1β на репарацию язвенных повреждений слизистой оболочки желудка // Цитокины и воспаление. – 2012. – Т. 11, №1. – С. 64-69.

Varjushina E.A., Alexandrov G.V., Sazonova T.A., Simbircev A.S. Study of the effect of local application of recombinant human interleukin-1β in the repair of ulcerative lesions of gastric mucosa. *Cytokines and Inflammation, 2012, Vol. 11, no.1, pp. 64-69.*

Описание статьи из книги (монографии):

Соколова Г.Н., Потапова В.Б. Клинико-патогенетические аспекты язвенной болезни желудка. – М.: Анахарсис, 2009. – 328 с.

Sokolova G.N., Potapova V.B. Clinical and pathogenetic aspects of gastric ulcer. *Moscow: Anacharsis, 2009, 328 p.*

Примеры правильного оформления англоязычных ссылок:

Wells S.M., Kantor A.B., Stall A.M. CD43(S7) expression identifies peripheral B-cell subsets. J. Immunol., 1994, Vol. 153, no. 12, pp. 5503-5515.

Goodman J.W., Parslow T.G. Immunoglobulin proteins. Basic and Clinical Immunology. Ed. Stites D.P., Terr A.I., Parslow T.G., Appletion & 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, нарисуночные 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 библиографческим 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

Акопджанян А.А. 635
Албегова Д.З. 629
Антонов А.В. 577
Аутеншлюс А.И. 567
Афанасьев М.С. 557
Бондарев В.П. 615
Борисевич И.В. .. 513, 615
Бурова Л.А. 521
Вараксин Н.А. 567
Васильев В.Б. 521
Вафин И.А. 577
Вержбицкая Н.Е. 577
Воронина Е.Н. 585
Выгодин В.А. 547
Газатова Н.Д. 529
Глушков А.Н. 577, 585
Гончаров А.Г. 529
Гордеева Л.А. 585
Гордукова М.А. 505
Дудникова Л.В. 537
Еремина А.В. 537
Зангинян А.В. 635
Захарян Г.В. 635
Иванов В.Б. 615
Казарян Г.С. 635
Караулов А.В. 557
Кашкина Н.Ю. 537
Кенкишвили А.О. 629
Кишкурно Н.И. 513
Козлов И.Г. 505, 629
Коненков В.И. 537
Корнилова О.Г. 513
Коростелева Е.В. 557
Корсунский А.А. 505
Корсунский И.А. 505
Костянко М.В. 577
Кудашева Э.Ю. ... 513, 615
Кунц Т.А. 567
Куртасова Л.М. 597
Лаптев О.С. 629
Леванова О.Н. 547
Лихванцева В.Г. .. 547, 557
Малащенко В.В. 529
Маммедова Дж.Т. 521
Маринкин И.О. 567
Мелащенко О.Б. 529
Меняйло М.Е. 529
Меркулов В.А. 615
Михайлова Е.С. 567
Мосягин В.Д. 615
Нерсесян С.Л. 585
Нечаев А.В. 513
Никифоров А.А. 547
Овсепян Л.М. 635
Оленникова Р.В. 585
Олефир Ю.В. 615
Оскорбина О.С. 585
Павлова С.И. 629
Парамонова Е.В. 513
Петрек Мартин 635
Поленок Е.Г. 577
Продеус А.П. 505
Прокофьев В.Ф. 537
Рагожина С.Е. 577
Руденко Е.А. 557
Селедцов В.И. 529
Селедцова Г.В. 529
Синяков А.А. 641
Смирнова О.В. 641
Смирнова С.В. 605
Смольникова М.В. 605
Соколов А.В. 521
Соколов В.А. 547
Соколова Е.А. 585
Старикова Э.А. 521
Трунов А.Н. 537
Филипенко М.Л. 585
Фрейдин М.Б. 605
Фрейдлин И.С. 521
Цуканов В.В. 641
Черешнев В.А. 489
Черных В.В. 537
Шакина Н.А. 597
Шаталина И.В. 585
Шевченко А.В. 537
Шмагель К.В. 489
Шмагель Н.Г. 489
Шмаров В.А. 529

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

активация лимфоцитов 529
аннексин 635
анти-D антитела 514
анти-А- и анти-В-гемагглютинины 514
антиидиотипические антитела 577
антитела 577
антитела к тиреоглобулину 557
антитела к тиреопероксидазе 557
апоптоз 635
аргининдеиминаза 521
атопия 606
болезнь Грейвса 557
бронхиальная астма 606
бронхит 597
ВИЧ-инфекция 489
возрастная макулярная дегенерация 538
воспаление 489, 606
генетический полиморфизм 585
глазная орбита 557
диабет 635
доклинические исследования 615
иммунная активация 489
иммуноглобулины 597
иммуносупрессия 629
интерлейкин-2 635
интерлейкин-8 529
канцерогенез 577
клинические исследования 615
контроль заболевания 606
критерии оценки 615
лейкоциты 635
лимфопения 489
лимфоцит 597
матриксные металлопротеиназы 547
метаболизм 597
метаболизм аргинина 521
методические подходы 615
методы гемагглютинации 514
миграция 521
микробная транслокация 489
невынашивание беременности 585
нейтрофильные гранулоциты 641
неонатальный скрининг 505
обструкция 597
первичная открытоугольная глаукома 547
ПИД 505
поликлональные активаторы 568
полиморфизм MMP 538
полиморфизм TNF 538
полиморфизм VEGF 538
полиморфизм гена CFH 547
полиморфизм генов 606
препараты иммуноглобулинов человека 514, 615
прогестерон 577
пролиферация 635
рак желудка 641
рак молочной железы 568, 577
ранний самопроизвольный выкидыш 585
регистрация 615
респираторная аллергия 629
рецептор к интерлейкину-8 529
рецидив 597
сетевой анализ 538
специфическая безопасность 514
супернатант 568
Т-лимфоциты 529
тиреоидные антитела 557
ТКИН 505
требования экспертного учреждения 615
фактор комплемента Н 547
фенотип 597
флавоноиды 629
функциональная активность 529
хемилюминесцентная активность 641
хронический гастрит 641
цитокины 489, 529, 568, 585, 606
цитоскелет 521
экзофтальм 557
экспертиза 615
эндокринная офтальмопатия 557
эндотелиальные клетки 521
эстрадиол 577
KREC 505
S. pyogenes 521
TREC 505

IX Всероссийская школа по клинической иммунологии

«ИММУНОЛОГИЯ ДЛЯ ВРАЧЕЙ»

28 января – 3 февраля 2018 года
Пушкинские Горы, Псковская область

Организаторы:

- Министерство здравоохранения Российской Федерации Российская Академия Наук
- Северо-Западное отделение медицинских наук
- Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека
- Комитет по науке и высшей школе Правительства Санкт-Петербурга
- Комитет по здравоохранению Правительства Санкт-Петербурга
- Администрация Псковской области
- ГНЦ – Институт иммунологии ФМБА России
- Институт экспериментальной медицины
- НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера Роспотребнадзора
- Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им.акад. И.П. Павлова
- Российское научное общество иммунологов
- Российская ассоциация аллергологов и клинических иммунологов
- Российское цитокиновое общество
- Ассоциация специалистов и организаций лабораторной службы «Федерация Лабораторной Медицины»
- Санкт-Петербургское региональное отделение Российской Ассоциации Аллергологов и Клинических Иммунологов

В программе школы:

- Лекции ведущих российских иммунологов
- Лекции зарубежных специалистов
- Семинары по практическим вопросам иммунологии

Пакет слушателя включает:

- Посещение лекций и семинаров
- Проживание
- 3-разовое питание
- Ежедневная культурная программа
- Трансфер Псков – Пушкинские Горы и обратно

Всем слушателям будут выданы удостоверения о тематическом усовершенствовании установленного образца и зарегистрированные на сайте НМО www.sovetnmo.ru получат 14 зачетных единиц (кредитов) по специальности: «аллергология и иммунология»

Координатор проекта:
Зам. председателя СПб РО РААКИ, академик РАН, Тотолян Арег Артемович
197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, 14
НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера
тел./факс: (812) 232-00-66
e-mail: totolian@spbraaci.ru

Заявки подавать до 1 декабря 2017 года.

Секретариат: Ракитянская Наталья Владимировна
Тел./факс: (812) 233-08-58
e-mail: shkola@spbraaci.ru
Адрес для корреспонденции: 197136, Санкт-Петербург, а/я 58, СПб РО РААКИ
www.spbraaci.ru
www.allergologi-immunologi.ru

ПОДПИСНОЙ ИНДЕКС:
РОСПЕЧАТЬ – 83030
ПРЕССА РОССИИ – 42311

ISSN 1563-0625